

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 737**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027	(2006.01)
A61K 35/28	(2015.01)
A61K 48/00	(2006.01)
C07K 14/00	(2006.01)
C07K 14/16	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)
C12N 9/90	(2006.01)
C12N 15/85	(2006.01)
C12N 15/867	(2006.01)
C12N 15/113	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2010 E 15166660 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2949208**

54 Título: **Vector dual para la inhibición del virus de la inmunodeficiencia humana**

30 Prioridad:

15.07.2009 US 225687 P
17.12.2009 US 287599 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2018

73 Titular/es:

CALIMMUNE INC. (100.0%)
5151 E. Broadway Blvd., Suite 1020
Tucson AZ 85711, US

72 Inventor/es:

BRETON, LOUIS RANDALL;
CHEN, IRVIN;
AN, DONG SUNG;
SYMONDS, GEOFFREY P.;
BOYD, MAUREEN y
MILLINGTON, MICHELLE L.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 657 737 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vector dual para la inhibición del virus de la inmunodeficiencia humana

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a los campos de biología molecular y de la virología. En particular, la invención se refiere a vectores de expresión útiles para el tratamiento y prevención de infecciones por VIH.

10 Antecedentes de la invención

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en seres humanos, que hace que el sistema inmunitario falle y aumenta la probabilidad de muerte debido a infecciones oportunistas. La infección por VIH es un gran problema de salud global, tal como se evidencia por su denominación como pandemia por la Organización Mundial de la Salud. La mayoría de las personas que están infectadas por el VIH acaban desarrollando SIDA, que sesga las vidas de más de un millón de personas cada año.

Las terapias antirretrovirales, tales como HAART (terapia antirretroviral altamente activa), que incluye combinaciones de inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, inhibidores de la proteasa, e inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos, han disminuido de manera drástica las tasas de morbilidad y mortalidad causadas por el VIH/SIDA en las regiones del mundo donde está disponible la terapia. Sin embargo, HAART no cura o elimina completamente todos los síntomas del VIH/SIDA. HAART también está asociada con diversos efectos secundarios, así como con la aparición de cepas de VIH que son resistentes a los inhibidores retrovirales. Por estos motivos, así como el alto coste de HAART y la necesidad de una adhesión estricta, dicha terapia puede ser relativamente ineficaz para un gran número de pacientes. El documento de Perez E.E. et al., (2005), *Clinical Immunology*, vol.115, págs. 26-32 describe la supresión de la infección por VIH-1 de linfocitos T CD4 tras la transducción con un vector de lentivirus que codifica una proteína inhibidora de la fusión de VIH (C46). Existe la necesidad en la técnica para desarrollar estrategias mejoradas para tratar y prevenir la infección por VIH.

30 Sumario de la invención

La invención es como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación proporciona un método para producir un vector de expresión vírica útil en una nueva estrategia terapéutica para tratar y/o prevenir la infección por VIH en la que se usan como diana dos etapas diferentes en la infección vírica mediante terapia génica. Por ejemplo, la presente invención proporciona un método, tal como se describe en las reivindicaciones, para producir un vector de expresión vírica que codifica un inhibidor de la entrada vírica en una célula hospedadora y un inhibidor de la fusión vírica. También se describe en el presente documento un vector que codifica un inhibidor de la replicación vírica. Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método, tal como se describe en las reivindicaciones, para producir un vector de expresión vírica que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de un correceptor de VIH y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que inhibe la fusión del VIH a la célula diana, en el que dicha primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a un primer promotor y dicha segunda secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a un segundo promotor. El vector de expresión puede ser un vector vírico, tal como un vector retrovírico o lentivírico. En algunas realizaciones, la primera y la segunda secuencia de ácido nucleico se transcriben a partir de un solo promotor. En una realización particular, hay presente un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) cadena arriba de la segunda secuencia de ácido nucleico.

En determinadas realizaciones, el vector de expresión comprende además una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de la entrada vírica, fusión vírica o replicación vírica. En algunas realizaciones, el tercer ácido nucleico está unido operativamente a un tercer promotor. En otras realizaciones, se transcriben dos de las tres secuencias de ácido nucleico a partir de un solo promotor (es decir, la primera y la segunda secuencia de ácido nucleico o la segunda y la tercera secuencia de ácido nucleico). En otras realizaciones adicionales, las tres secuencias de ácido nucleico se transcriben a partir de un solo promotor. Puede haber presentes uno o más IRES cadena arriba de la segunda y/o tercera secuencia de ácido nucleico.

De acuerdo con la invención, la primera secuencia de ácido nucleico del vector de expresión codifica una molécula de ácido nucleico inhibidora, que es un ARNip o ARNhp, que se dirige a un correceptor de VIH. En algunas realizaciones, la molécula de ARNip o ARNhp comprende una región bicatenaria que tiene una secuencia que es sustancialmente idéntica y complementaria a CCR5. En otras realizaciones, la molécula de ARNpi o ARNhc comprende una región bicatenaria que tiene una secuencia que es sustancialmente idéntica y complementaria a CXCR4.

En otra realización de la invención, la segunda secuencia de ácido nucleico del vector de expresión codifica una proteína que inhibe la fusión del VIH a la célula diana. La proteína inhibidora de la fusión de VIH puede ser una proteína C46 u otras proteínas similares que inhiben la fusión del VIH a la superficie celular y se expresan por transgén para que estén situadas en la superficie celular (por ejemplo, T20 y sus proteínas relacionadas, enfuvirtida, CP32M, y sifuvirtida).

En otra realización más de la invención, el vector puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que inhibe la replicación del VIH. Por ejemplo, en algunas realizaciones, esta secuencia de ácido nucleico codifica una proteína TRIM5 α o un derivado o fusión de la misma. En determinadas realizaciones, esta secuencia de ácido nucleico codifica una TRIM5 α quimérica en la que el dominio amino terminal es de una proteína TRIM5 α humana y el dominio PRYSPRY carboxilo terminal es de una proteína TRIM5 α de mono rhesus. En otras realizaciones, esta secuencia de ácido nucleico codifica una proteína de fusión TRIM5-ciclofilina.

En una realización de la invención, el vector de expresión comprende una primera, una segunda y una tercera secuencia de ácido nucleico, en el que la primera secuencia de ácido nucleico codifica un inhibidor ARNip o ARNhp de un correceptor de VIH (por ejemplo, ARNhp para CCR5 o CXCR4), la segunda secuencia de ácido nucleico codifica un inhibidor de la fusión (por ejemplo, C46), y la tercera secuencia de ácido nucleico codifica un inhibidor de la replicación del VIH (por ejemplo, una proteína TRIM5 α o un derivado o fusión de la misma).

En algunas realizaciones de la invención, el inhibidor de un correceptor de VIH y el inhibidor de la fusión del VIH a la célula diana o el inhibidor de la replicación del VIH se expresan a partir de diferentes promotores en el vector de expresión. En una realización, el inhibidor de un correceptor de VH (por ejemplo, CCR5 o CXCR4) se expresa a partir de un promotor de ARN polimerasa III, mientras que el inhibidor de la fusión y/o replicación del VIH se expresa a partir de un promotor de ARN polimerasa II. Los dos inhibidores diferentes pueden expresarse en diferentes proporciones a partir de la construcción de expresión.

La presente invención proporciona métodos para preparar los vectores de expresión descritos en el presente documento así como composiciones farmacéuticas que comprenden los nuevos vectores de expresión. Por ejemplo, en una realización, el método para producir un vector de expresión vírico que, cuando está presente en una célula, es capaz de inhibir la unión del VIH a la célula y evita la fusión del VIH a la célula o la replicación del VIH, comprende sintetizar un ADNc de un gen que expresa una proteína capaz de prevenir la fusión del VIH a la célula o la replicación del VIH; clonar el ADNc sintetizado en un sitio de restricción en un vector vírico; e insertar una unidad de expresión capaz de regular negativamente la expresión de un correceptor de VIH en un sitio de restricción en el vector.

También se describe en el presente documento un método para tratar o prevenir la infección por VIH en un paciente. En un aspecto, el método comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión de la invención. La administración de dicha composición puede conferir resistencia a la infección por las cepas trópicas R5 y X4 de VIH. En un aspecto, el paciente es humano. El paciente puede ser negativo a VIH o positivo a VIH. En algunos aspectos, el paciente puede no haberse sometido previamente a terapia HAART, estar recibiendo terapia HAART, estar fracasando o haber fracasado la terapia HAART. En otros aspectos, el paciente puede tener SIDA completamente desarrollado (por ejemplo, SIDA/linfoma).

En otro aspecto, el método comprende transducir células hematopoyéticas (por ejemplo, HPSC, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, o monocitos/macrófagos) con un vector de expresión de la invención y trasplantar dichas células transducidas al paciente, en la que dichas células transducidas son resistentes a la infección por VIH. En un aspecto, las células hematopoyéticas son células progenitoras/madre hematopoyéticas (HPSC) que generan granulocitos, monocitos/macrófagos, y linfocitos que son resistentes a la infección por VIH después del trasplante a un paciente. En algunos aspectos, las HPSC son autólogos y positivos a CD34. Las HPSC transducidas pueden generar granulocitos, monocitos/macrófagos, y linfocitos que son resistentes a la infección por las cepas trópicas R5 y X4 de VIH. En ciertos aspectos, las HPSC transducidas pueden generar granulocitos, monocitos/macrófagos, y linfocitos que son resistentes a la infección por cepas de VIH que son resistentes a la HAART.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto indique lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones, tales como "comprenden" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento indicado, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Para que la presente invención pueda entenderse más claramente, las realizaciones preferidas se describirán con referencia a los siguientes dibujos y ejemplos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Construcciones de vector lentiviral. Esquema que muestra los elementos importantes que comprenden cada uno de los vectores indicados. El vector dual sh5/C46 se muestra resaltado por una línea de puntos alrededor.

Figura 2. Construcciones de estructura. Esquema que muestra los elementos importantes que comprenden cada vector lentiviral de estructura. p, significa plásmido. pFG11F se obtuvo a partir de pFG12 mediante la inserción de sitios de clonación múltiple (MCS) en varias ubicaciones cadena arriba del promotor de ubiquitina (Ubc).

Figura 3. Vectores derivados de la estructura de FG12. Esquema que representa la derivación de pFG12-H1-R5-U-EGFP y pFG12-H1-R5.

Figura 4. Vectores derivados de la estructura de FG11F. Esquema que representa la derivación de pFG11F-U-C46 y pFG11F-H1-R5-U-C46.

Figura 5. Producción de lentivirus. Esquema (panel izquierdo) que muestra el genoma de VIH-1 de tipo silvestre y los vectores genéricos usados en el sistema de co-transfección transitoria: 1. Plásmido de vector de VIH (vector de ensayo, por ejemplo, construcciones mostradas en las Figuras 1-4); 2-4 los diversos plásmidos auxiliares. Esquema en la caja con línea discontinua (panel derecho) que muestra los elementos de los plásmidos auxiliares reales usados en la producción lentiviral.

Figura 6. Estabilidad de la expresión en células CEM.NKR.CCR5. Análisis FACS de células CEM.NKR.CCR5 transducidas con las construcciones indicadas a las 4 y 8 semanas en cultivo. Las células se analizaron respecto de la expresión de CCR5 (mediante anticuerpo de CD195), la expresión de C46 (mediante anticuerpo de 2F5), y la expresión de EGFP. La expresión de GFP se observa para las construcciones que contienen EGFP (control de GFP y sh5/EGFP; paneles 1, 3), se observa una reducción en la expresión de CCR5 para las construcciones que contienen sh5 (sh5, sh5/EGFP, y sh5/C46; paneles 2, 3, 5), y la expresión de C46 se observa para las construcciones que contienen C46 (C46 y sh5/C46; paneles 4, 5). Se muestran los porcentajes de células positivas en cada cuadrante de citometría de flujo (Q1-Q4). Se observan resultados similares a las 4 y 8 semanas.

Figura 7. Estabilidad de la expresión en células Molt4/CCR5. Análisis FACS de células Molt4/CCR5 transducidas con las construcciones indicadas a las 4 y 8 semanas en cultivo. Las células se analizaron respecto de la expresión de CCR5 (mediante anticuerpo de CD195), la expresión de C46 (mediante anticuerpo de 2F5), y la expresión de EGFP. La expresión de GFP se observa para las construcciones que contienen EGFP (control de GFP y sh5/EGFP; paneles 1,3), se observa una reducción en la expresión de CCR5 para las construcciones que contienen sh5 (sh5, sh5/EGFP, y sh5/C46; paneles 2, 3, 5), y la expresión de C46 se observa para las construcciones que contienen C46 (C46 y sh5/C46; paneles 4, 5). Se muestran los porcentajes de células positivas en cada cuadrante de citometría de flujo (Q1-Q4). Se observan resultados similares a las 4 y 8 semanas.

Figura 8. Características de crecimiento de células CEM.NKR.CCR5 transducidas. Diagrama de barras que muestra el número de células CEM.NKR.CCR5 transducidas con las construcciones lentivirales indicadas a los 4-7 días después de sembrar a las concentraciones indicadas; se muestran 4 siembras independientes en el eje X numeradas 1-4. La transducción con las diversas construcciones (sh5(2), sh5/EGFP(3), C46(4), sh5/C46(5)) no tuvieron efecto en la velocidad de crecimiento de las células en comparación con las células no transducidas (1).

Figura 9. Métodos de transducción para células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Se transdujeron PBMC con una construcción lentiviral de sh5/EGFP de una de las cuatro formas siguientes: Transducción 1x con virus que contiene medio (VCM), transducción 2x con VCM, transducción 1x con precarga de VCM (1 x precarga), transducción 2x con precarga de VCM (2 x precarga), y VCM concentrado. **A.** Análisis por citometría de flujo de PBMC transducidas con la construcción lentiviral de sh5/EGFP con los métodos indicados. **B.** Resumen del porcentaje de células EFGP positivas para cada método de transducción. Los resultados demuestran que la transducción fue más eficiente con virus concentrado, seguido de 2X precarga, 1X precarga, después suspensión 2X y 1X; se muestran dos replicados para cada uno.

Figura 10. Transducción de PBMC. Análisis FACS de PBMC transducidos con las construcciones indicadas a los 4 días después de la transducción. Se observa expresión de GFP para las construcciones que contienen EGFP (paneles 1, 2); se observa regulación negativa de CCR5 para las construcciones que contienen sh5 (paneles 2 y 4), y se observa expresión de C46 (medida mediante anticuerpo de 2F5) para las construcciones que contienen C46 (paneles 3, 4). Los valores de MFI, de izquierda a derecha, fueron 16,2, 8,4, 16,8, 9,4.

Figura 11. Comparación de expresión génica en PBMC transducidos (en el día 4) y linfocitos T CEM.NKR.CCR5 transducidos (en la semana 8). Se observan patrones de expresión similares entre los dos tipos celulares. Se observa expresión de GFP en células transducidas con las construcciones que contienen EGFP (paneles 1, 2); La expresión de CCR5 se reduce en células transducidas con las construcciones que contienen sh5 (paneles 2 y 4), y se observa expresión de C46 (medida mediante anticuerpo de 2F5) en células transducidas con las construcciones que contienen C46 (paneles 3, 4).

Figura 12. Características de crecimiento de PBMC humanas transducidas. Las células totales/pocillo (panel A) y el porcentaje de células viables (panel B) fueron similares para PBMC transducidas con cada una de las construcciones indicadas y para PBMC que no se transdujeron. Se muestran dos siembras por duplicado de cada grupo.

Figura 13. Estabilidad de la expresión del transgén en PBMC. Análisis FACS de PBMC transducidas con las construcciones indicadas a los 4, 7 y 12 días después de la transducción. Se analizó la expresión de GFP, CCR5, y C46 (medida mediante anticuerpo de 2F5). La expresión de GFP se observa en los paneles 1, 3; la expresión de

sh5 se observa en los paneles 2, 3, 5 y la expresión de C46 se observa en los paneles 4, 5.

Figura 14. Aislamiento y transducción de CD34+. Análisis FACS de poblaciones de células mononucleares humanas antes (pre-separación) y después (post-separación) del aislamiento de células CD34+ mediante separación celular de anticuerpos magnéticos (panel superior). Análisis FACS de células madre hematopoyéticas CD34+ transducidas con las construcciones indicadas (panel inferior). La expresión de GFP se observa en los paneles 1, 2; la expresión de C46 no se observa en los paneles 4, 5.

Figura 15. Exposición a VIH con cepa SF2 trópica dual en células Molt4/CCR5. Las células Molt4/CCR5 bien no se transdujeron o se transdujeron con vector lentiviral sh5/C46 y posteriormente se expusieron a virus trópico dual SF2-VIH (CCR5 y CXCR4) a una multiplicidad de infección (MOI) variante - 0,2, 0,02, 0,002. Los niveles de proteína P24 se evaluaron 13 días después de la exposición viral como medida de la infección por VIH.

Figura 16. Exposición a VIH con cepa SF2 trópica dual en células Molt4/CCR5. Las células Molt4/CCR5 bien no se transdujeron o se transdujeron con construcciones lentivirales sh5/C46 o C46 y posteriormente se expusieron a virus trópico dual SF2-VIH (CCR5 y CXCR4) a dos multiplicidades de infección (MOI) diferentes - 0,2 y 0,02. Los niveles de proteína P24 se evaluaron 11 días después de la exposición viral como medida de la infección por VIH (panel superior). Análisis FACS de células Molt4/CCR5 no transducidas o células Molt4/CCR5 transducidas con construcciones lentivirales C46 o sh5/C46 en el día de exposición al virus (panel inferior). Se evaluó la expresión de CCR5 y de C46 (medida mediante anticuerpo de 2F5).

Figura 17. Exposición a VIH con cepa SF2 trópica dual en células Molt4/CCR5. Las células Molt4/CCR5 bien no se transdujeron o se transdujeron con construcciones lentivirales de C46 (Gen 2) o sh5/C46 (G2R5) y posteriormente se expusieron a virus trópico dual HIV-SF2 (CCR5 y CXCR4), Bal (trópico CCR5) o NL4-3 (trópico CXCR4) a un MOI de 0,2. Los niveles de proteína P24 se evaluaron 11 días después de la exposición viral como medida de la infección por VIH. La numeración de los histogramas (1-6) se refiere a las cepas de VIH que se usaron (véase la leyenda en el lateral derecho).

Figura 18. Exposición a VIH con cepa trópica CCR5 Bal en células Molt4/CCR5. Las células Molt4/CCR5 bien no se transdujeron (Molt4) o se transdujeron con una de las siguientes cuatro construcciones lentivirales: sh5 (R5); C46 (G2); sh5/C46 (R5-G2); o sh5/EGFP (R5-GFP). El grupo "mixto" es una mezcla de no transducidas, sh5, C46, sh5/C46 todas mezcladas por igual (es decir, un 25 % de cada tipo). Las células se expusieron posteriormente a virus trópico VIH-Bal CCR5 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,2. Los niveles de proteína P24 se evaluaron a los 7 y 10 días (primer y segundo histograma, respectivamente, para cada tratamiento) después de la exposición viral como medida de la infección por VIH.

Figura 19. Exposición a VIH en células mononucleares de sangre periférica. A. Diagrama de la construcción dual sh1005/C46. **B.** Se transdujeron PBMC con una de las cuatro siguientes construcciones lentivirales: sh5/C46 (LVsh5C46); C46 (LVC46); sh5/GFP (LVsh5-GFP); o control de GFP (LV-GFP). Análisis FACS de PBMC transducidas cuatro días después de la transducción. **C.** Dieciséis días después de la transducción, se expuso a las células mostradas en el panel B bien con una cepa trópica CCR5 (R5) o trópica CXCR4 (X4) de VIH y se determinaron los niveles de proteína p24 en sobrenadantes de cultivo cuatro días después de la exposición viral.

Figura 20. Reducción eficiente de CCR5 en el ratón NOD SCID-hu BLT. A. Citometría de flujo. El porcentaje de expresión de CCR5 en linfocitos T CD4+ EGFP+ (panel superior) y mCherry+ (panel inferior) se examinó mediante análisis FACS en órganos linfoides de ratones reconstituidos. Se muestran datos representativos de un ratón a las 20 semanas después de la reconstitución. Thy/Liv: Organoide similar al timo humano trasplantado. LPL: Linfocitos de la lámina propia. **B. Inhibición de VIH-1 trópico CCR5 ex vivo.** Se activaron esplenocitos aislados de un ratón trasplantados con PHA durante 2 días e IL-2 durante 5 días y se eliminaron las células CD8+. Las células se clasificaron para EGFP+ y mCherry+ a purezas de más del 99 %. Las células clasificadas EGFP+ (rombo negro) y mCherry+ (cuadrado abierto) (4×10^4) se infectaron con R5 VIH-1_{NFNSXSL9} o X4 VIH-1_{NL4-3} a una MOI de 2,5 en paralelo y por triplicado. Las células se lavaron 3 veces después de la infección. La cantidad de partículas de VIH-1 de entrada restantes en el sobrenadante de cultivo se controló 1 hora después de la infección mediante un ensayo ELISA de p24 de VIH. La cantidad de producción de VIH en sobrenadante de cultivo se controló en los días 4, 7 y 12 después de la infección durante el cultivo. **C. Ventaja selectiva de linfocitos T CD4+ regulados negativamente para CCR5 in vivo.** Los ratones reconstituidos se infectaron con VIH-1_{NFNSXSL9} trópico R5 (dosis = 200 ng de p24) a las 9 semanas después del trasplante de HPSC. La cinética del % de población de linfocitos T EGFP+ CD4+ (barra gris) en sangre periférica se controló durante 8 semanas después de la inyección de VIH trópico R5. El % de población de linfocitos T mCherry+ CD4+ (barra blanca) se controló con el mismo animal. El % de EGFP+ y el % de mCherry+ se mantuvieron en ratones no infectados por VIH a las 17 después del trasplante de HPSC (datos no mostrados). Se muestran los datos representativos. **D. Mantenimiento selectivo de la relación CD4/CD8 in vivo.** La cinética de la relación CD4/CD8 en la población de linfocitos T EGFP+ CD45+ (barra gris) en sangre periférica se controló durante 8 semanas después de la inyección de VIH trópico R5. La relación CD4/CD8 en % de la población de linfocitos T mCherry+ CD4+ (barra blanca) se controló en el mismo animal. Se muestra un animal representativo. La relación CD4/CD8 en células EGFP+ y mCherry+ CD45+ se mantuvo por encima de 1 en ratones no infectados por HIV a las 17 semanas después del trasplante de HPSC

(datos no mostrados).

Figura 21. Impacto predicho de la introducción de células CD34+ y/o CD4+ transducidas con sh4/C46 en un individuo VIH+ no expuesto previamente a HAART. Carga viral predicha (A) y recuento de CD4 (B) en pacientes tratados con una dosis de células transducidas (estrellas) frente a pacientes no tratados (triángulos).

Figura 22. Impacto predicho de la introducción de células CD34+ y/o CD4+ transducidas con sh4/C46 en un individuo VIH+ con un régimen HAART bien controlado. El eje y ilustra la carga viral predicha. El eje x detalla cuando se está tomando la terapia antirretroviral (ART) o cuando instituye una interrupción de tratamiento analítico (ATI). Se muestran las cargas virales predichas para pacientes tratados con una dosis de células transducidas (estrellas) frente a pacientes no tratados (triángulos).

Figura 23. Impacto predicho de la introducción de células CD34+ y/o CD4+ transducidas con sh4/C46 en un individuo VIH+ con fracaso de HAART. Carga viral predicha (A) y recuento de CD4 (B) en pacientes tratados con una dosis de células transducidas (estrellas) frente a pacientes no tratados (triángulos).

Figura 24. Construcción lentiviral dual con ARNhc que se dirige a CCR5 y una proteína TRIM5 α . A. Esquema que muestra los elementos de pFG11F-H1-R5-U-TRIM5 α . B. Esquema que muestra la derivación del vector triple pFG11F-H1- R5-U-C46-B-TRIM5 α .

Descripción detallada de la invención

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

La presente invención se basa, en parte, en el reconocimiento de que una estrategia terapéutica que se dirige a genes y/o proteínas no de VIH (esto es, genes o proteínas de la célula hospedadora) disminuye la probabilidad de que puedan surgir nuevas cepas de VIH resistentes a los inhibidores. En particular, la presente invención proporciona vectores y métodos para usar dichos vectores para prevenir o tratar la infección por VIH dirigiéndose a o empleando proteínas celulares que afectan a diferentes etapas del ciclo vital del VIH. Por ejemplo, en una realización, el vector es capaz de expresar un inhibidor de entrada vírica (unión) y un inhibidor de fusión vírica con la membrana celular. En otra realización, el vector es capaz de expresar un inhibidor de la entrada vírica y un inhibidor de la replicación vírica. Por consiguiente, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de un correceptor de VIH y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que inhibe la fusión vírica del VIH a una célula diana.

En una realización particular, los tres elementos (por ejemplo, un inhibidor de un correceptor de VIH, una proteína que inhibe la fusión viral del VIH a una célula diana y una proteína que inhibe la replicación del VIH) se combinan en un vector. Por ejemplo, en una realización, el vector de expresión comprende una primera, una segunda y una tercera secuencia de ácido nucleico, en el que la primera secuencia de ácido nucleico codifica un inhibidor de un correceptor de VIH (por ejemplo, ARNhp para CCR5 o CXCR4), la segunda secuencia de ácido nucleico codifica un inhibidor de la fusión (por ejemplo, C46), y la tercera secuencia de ácido nucleico codifica un inhibidor de la replicación del VIH (por ejemplo, una proteína TRIM5 α o un derivado o fusión de la misma). En otra realización, el vector de expresión comprende una primera, una segunda y una tercera secuencia de ácido nucleico, en el que la primera secuencia de ácido nucleico codifica un primer inhibidor de un correceptor de VIH (por ejemplo, ARNhc para CCR5), la segunda secuencia de ácido nucleico codifica un segundo inhibidor de un correceptor de VIH (por ejemplo, ARNhc para CXCR4), y la tercera secuencia de ácido nucleico codifica un inhibidor de la fusión viral del VIH a una célula diana (por ejemplo, C46).

Tal como se usa en el presente documento, "vector de expresión" o "vector" se refiere a una composición de materia que puede usarse para administrar ácidos nucleicos de interés al interior de una célula, de tal forma que se expresarán por la célula. Se conocen en la técnica numerosos vectores, incluyendo, pero sin limitación, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos y vectores virales. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero sin limitación, vectores adenovirales, vectores virales adeno-asociados, vectores retrovirales (incluyendo vectores lentivirales), y similares. En una realización, el vector de expresión es un vector viral. Preferentemente, el vector viral es un vector retroviral o lentiviral.

Los "retrovirus" son virus que tienen un genoma de ARN que se retrotranscribe mediante la transcriptasa inversa retroviral a una copia de ADNc que se integra en el genoma de la célula hospedadora. Se conocen en la técnica vectores retrovirales y métodos para producir vectores retrovirales. En resumen, para construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucleico que codifica un gen de interés en el genoma viral en el lugar de determinadas secuencias virales para producir un virus que es defectuoso para replicación. Para producir viriones, se construye una línea celular empaquetadora que contiene los genes gag, pol y env pero sin el LTR y los componentes de empaquetamiento (Mann et al., Cell, Vol. 33:153-159, 1983). Cuando se introduce un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con el LTR retroviral y las secuencias de empaquetamiento en esta línea celular, la secuencia empaquetadora permite que se empaquete el transcrito de ARN del plásmido recombinante en partículas virales, que después se secretan al medio de cultivo. Entonces se recoge el medio que contiene los retrovirus recombinantes, se concentra opcionalmente, y se usa

para la transferencia génica (véase el Ejemplo 1).

"Lentivirus" se refiere a un género de retrovirus que es capaz de infectar a células en división o no en división. Varios ejemplos de lentivirus incluyen VIH (virus de la inmunodeficiencia humana: incluyendo VIH de tipo 1, y VIH de tipo 2), el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en humanos; visna-maedi, que causa encefalitis (visna) o neumonía (maedi) en ovejas, el virus de la artritis-encefalitis caprina, que causa inmunodeficiencia, artritis, y encefalopatía en cabras; el virus de la anemia infecciosa equina, que causa anemia hemolítica autoinmune, y encefalopatía en caballos; el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), que causa inmunodeficiencia en gatos; el virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB), que causa linfadenopatía, linfocitosis, y posiblemente infección del sistema nervioso central en ganado, y el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS), que causa inmunodeficiencia y encefalopatía en primates sub-humanos.

Un "virus híbrido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un virus que tienen componentes de otros uno o más vectores virales, incluyendo elementos de vectores no retrovirales, por ejemplo, híbridos adenovirales-retrovirales. Tal como se usa en el presente documento, los vectores híbridos que tienen un componente retroviral tienen que considerarse dentro del alcance de los retrovirus.

Un retrovirus "seudotipado" es una partícula retroviral que tiene una proteína de envuelta que es de un virus distinto al del virus del que se deriva el genoma de ARN. La proteína de la envuelta puede ser de un retrovirus diferente o de un virus no retroviral. Una proteína de envuelta preferida es la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV G). Sin embargo, para eliminar la posibilidad de infección en seres humanos, los virus pueden, como alternativa, seudotiparse con proteína de envuelta ecotrópica que limita la infección a una especie concreta, tal como ratones o aves. Por ejemplo, en una realización, se usa una proteína de envuelta ecotrópica mutante, tal como la proteína de envuelta ecotrópica 4.17 (Powell et al., Nature Biotechnology 18(12):1279-1282 (2000)).

El término "provirus" se usa para referirse a una secuencia de ADN bicatenario presente en un cromosoma de eucariota que corresponde al genoma de un retrovirus de ARN. El provirus puede transmitirse de una generación de células a la siguiente sin provocar la lisis o destrucción de la célula hospedadora.

Un genoma lentiviral se organiza generalmente en una repetición larga terminal 5' (LTR), el gen gag, el gen pol, el gen env, los genes accesorios (nef, vif, vpr, vpu) y un 3'LTR. El LTR viral se divide en tres regiones denominadas U3, R y U5. La región U3 contiene los elementos potenciadores y promotores. La región U5 contiene las señales de poliadenilación. La región R (repetición) separa las regiones U3 y U5 y las secuencias transcritas de la región R aparecen en los extremos tanto 5' como 3' del ARN viral. Véanse, por ejemplo, "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed. Oxford University Press, (2000)); O Narayan y Clements (1989) J. Gen. Virology, Vol. 70:1617-1639; Fields et al. (1990) Fundamental Virology Raven Press.; Miyoshi H, Blamer U, Takahashi M, Gage F H, Verma I M. (1998) J Virol., Vol. 72(10):8150-7, y la Patente de los Estados Unidos N° 6.013.516.

Se conocen en la técnica vectores lentivíricos, incluyendo varios que se han usado para infectar células progenitoras/madre hematopoyéticas (HPSC). Dichos vectores pueden encontrarse, por ejemplo, en las siguientes publicaciones, que se incorporan en el presente documento por referencia: Evans et al., Hum Gene Ther., Vol. 10:1479-1489, 1999; Case et al., Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 96:2988-2993, 1999; Uchida et al., Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 95:11939-11944, 1998; Miyoshi et al., Science, Vol. 283:682-686, 1999; y Sutton et al., J. Virol., Vol. 72:5781-5788, 1998. En una realización, el vector de expresión es un lentivirus modificado y por lo tanto es capaz de infectar a células tanto en división como no en división. Dichos vectores lentivíricos comprenden un genoma lentivírico modificado que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de un correceptor de VIH y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que inhibe la fusión del VIH a una célula diana o replicación de VIH. Además, el genoma lentivírico modificado carece preferentemente de genes para proteínas lentivíricas necesarias para la replicación vírica, evitando de este modo la replicación no deseada, tal como la replicación en las células diana. Las proteínas necesarias para la replicación del genoma modificado se proporcionan preferentemente in trans en la línea celular empaquetadora durante la producción del retrovirus (o específicamente, lentivirus) recombinante. En una realización, la línea celular empaquetadora es una línea celular 293T. El vector lentivírico comprende preferentemente secuencias de las repeticiones terminales largas (LTR) 5' y 3' de un lentivirus. En una realización, la construcción vírica comprende las secuencias R y U5 del 5'LTR de un lentivirus y un 3'LTR inactivado o autodesactivante de un lentivirus. Las secuencias de LTR pueden ser secuencias de LTR de cualquier lentivirus, incluyendo de cualquier especie o cepa. Por ejemplo, el LTR puede ser secuencias de LTR de VIH, del virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS), del virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) o del virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB). Preferentemente, las secuencias de LTR son secuencias de LTR de VIH.

En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende un 3'LTR desactivado o autodesactivante, es decir, el vector lentiviral es autodesactivante. Un "3'LTR autodesactivante" es un 3'LTR que contiene una mutación, sustitución o eliminación que evita que las secuencias de LTR dirijan la expresión de un gen cadena abajo. Una copia de la región U3 del 3'LTR actúa como molde para la generación de ambos LTR en el provirus integrado. Por lo tanto, cuando el 3'LTR con una eliminación o mutación inactivante se integra como el 5'LTR del provirus, no es posible la transcripción a partir del 5'LTR. Esto elimina la competición entre el potenciador/promotor viral y cualquier potenciador/promotor interno. Los 3'LTR autoinactivantes se describen, por ejemplo, en Zufferey et al., J. Virol., Vol. 72:9873-9880, 1998;

Miyoshi et al., J. Virol., Vol. 72:8150-8157, 1998; e Iwakuma et al., Virology, Vol. 261:120-132, 1999. El 3'LTR puede hacerse autoinactivante mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización, el elemento U3 del 3'LTR contiene una eliminación de su secuencia potenciadora, preferentemente la caja de TATA, Spl y los sitios de NF-kappa B. Como resultado del 3'LTR autoinactivante, el provirus que se integra en el genoma de la célula hospedadora comprenderá un 5'LTR inactivado. Los vectores de expresión viral de la invención, preferentemente, no inhiben la producción de vector de las células productoras. En determinadas realizaciones, el vector de expresión viral carece sustancialmente de toxicidad para las células transducidas y las contenedoras del gen.

El vector de expresión de la invención comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de un correceptor de VIH. En una realización, el correceptor de VIH es el receptor 5 de quimiocinas CC (CCR5). CCR5 es el principal correceptor de VIH-1 para cepas trópicas de macrófagos y es esencial para la infección por VIH. Los estudios de genética de poblaciones han demostrado que los individuos homocigotos para un gen CCR5 defectuoso (por ejemplo, CCR5Δ32) están protegidos frente a la infección por VIH. Interesantemente, los individuos heterocigotos que muestran una reducción del 50 % de CCR5 sobre las células tienen una velocidad de progresión de la enfermedad sustancialmente reducida. Los individuos que son homocigotos para el alelo CCR5Δ32 parecen ser normales salvo por una susceptibilidad aumentada al virus de la encefalitis del nilo occidental. Un inhibidor de CCR5 de molécula pequeña, Maraviroc, ha sido aprobado por la FDA para su uso en seres humanos. Este inhibidor es eficaz para prevenir la infección por VIH-1 y aunque se observaron algunos efectos adversos, dichos efectos no parecieron ser el resultado del bloqueo de CCR5 en sí. Como era de esperar, el VIH-1 genera resistencia, sin embargo, de manera interesante, la forma principal de resistencia parece ser variantes de VIH-1 que se adaptan para usar la forma ocupada por el fármaco de CCR5 en vez del receptor 4 de quimiocinas CXCR4 (CXCR4) u otros correceptores. Por lo tanto, el *knockdown* de CCR5 (tal como con ARNpi, ARNhc, o antisentido) puede ser más eficaz que bloquear el acceso. En otra realización de la invención, el correceptor de VIH usado como diana es CXCR4, que es el principal correceptor de cepas trópicas de linfocitos T.

El inhibidor de un correceptor de VIH es un ácido nucleico inhibidor. Como se usa en el presente documento, un ácido nucleico inhibidor incluye, pero sin limitación, un ARN pequeño interferente (ARNip) o un ARN de horquilla corta (ARNhp). Por lo tanto, en una realización, la primera secuencia de ácido nucleico codifica un ácido nucleico inhibidor que se dirige a un correceptor de VIH. "Diana" se refiere a la capacidad del inhibidor para unirse a y/o interferir con un transcrito endógeno que codifica el correceptor de VIH. Por ejemplo, el ácido nucleico inhibidor puede tener una secuencia que es sustancialmente complementaria con un ácido nucleico que codifica el correceptor de VIH, de tal forma que el ácido nucleico inhibidor se une al ácido nucleico que codifica el correceptor de VIH, bloqueando de este modo la expresión o iniciando la degradación del ácido nucleico del correceptor. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el inhibidor de un correceptor de VIH es capaz de reducir la expresión del correceptor de VIH cuando se expresa el vector de expresión que codifica dicho inhibidor en una célula hospedadora.

Un "ARN pequeño de interferencia" o "ARNpi" es una molécula de ARN bicatenario que es capaz de inhibir la expresión de un gen con el que comparte homología. La región del gen u otra secuencia nucleotídica con la que existe homología se conoce como la "región diana". En una realización, el ARNip puede ser una molécula de ARN en "horquilla" o de tallo-bucle (ARNhp), que comprende una región con sentido, una región de bucle y una región antisentido complementaria a la región con sentido. En otras realizaciones, el ARNip comprende dos moléculas de ARN distintas que están asociadas de manera no covalente para formar un dúplex.

En algunas realizaciones, un vector de expresión de la invención comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia que es sustancialmente complementaria a al menos una porción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un correceptor de VIH, tal como CCR5 y/o CXCR4. Tal como se usa en el presente documento, "sustancialmente complementaria" se refiere a una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 93 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % complementaria a una secuencia de polinucleótido diana. En una realización, el oligonucleótido antisentido tiene una secuencia que es 100 % complementaria a al menos una porción de una secuencia de ácido nucleico que codifica CCR5 o CXCR4. El oligonucleótido antisentido puede ser de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, y en algunas realizaciones de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud.

En otras realizaciones, un vector de expresión de la invención comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un ARNip o ARNhp. El ARNip o ARNhp tiene preferentemente una región bicatenaria que comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica y complementaria a una porción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un correceptor de VIH, que es al menos aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica y complementaria a una porción de un ácido nucleico que codifica CCR5 o CXCR4. En una realización, el ARNip o ARNhp tiene una región bicatenaria que comprende una secuencia que es un 100 % idéntica y complementaria a una secuencia de correceptor de VIH (por ejemplo, CCR5 y/o CXCR4). La región bicatenaria del ARNip o ARNhp puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, más preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, tal como de 20 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, la primera secuencia de ácido nucleico del vector de expresión codifica un ARNhp que tiene una estructura de tallo-bucle, en el que la región de tallo o bicatenaria es sustancialmente idéntica y complementaria a una secuencia de CCR5 o CXCR4. La región de bucle del ARNhp puede comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 15

nucleótidos. En una realización particular, la primera secuencia de ácido nucleico codifica un ARNhp que comprende una secuencia de 5'-GAG- GAGCAAGCUC AGUUUACACC UUGUCCGACG GUGUAAACUG AGCUUGCUCU U -3' (SEQ ID NO: 1).

- 5 El vector de expresión de la invención comprende preferentemente una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que inhibe la fusión del VIH a una célula diana o replicación de VIH. En algunas realizaciones, la proteína que inhibe la fusión del VIH a una célula diana es una proteína C46. C46 es un inhibidor de la fusión anclado a la membrana derivado de la héptada repetitiva C-terminal de gp41 de VIH fusionado con una región bisagra de inmunoglobulina humana y un dominio transmembrana de CD34. C46 es un potente inhibidor de la fusión de VIH, en un sentido análogo al fármaco soluble aprobado por la FDA, enfuvirtida (T20) y actúa en un punto en el ciclo viral del VIH distinto a la unión al correceptor de CCR5. En una realización, se probó la seguridad de C46 en un ensayo clínico de fase I en el que los pacientes recibieron una infusión de linfocitos T autólogos transducidos con vector retroviral de C46. En otro aspecto, los pacientes no tuvieron efectos adversos relacionados con la terapia génica y no desarrollaron reacciones inmunes anti-C46 evidentes. En una realización, la segunda secuencia de ácido nucleico codifica una proteína C46 que comprende una secuencia de:

MGAGATGRAM DGPRLLLLLL LGVSLGGARS WMEWDREINN YTSLIHSLIE ESQNOQEKNE
QELLELDKWA SLWNWFRSER KCCVBCPPCP APPVAGPLIA LVTSGALLAV LGITGYFLMN
RRSWSPTGER LELEP (SEQ ID NO: 2).

En otra realización, el segundo ácido nucleico comprende una secuencia de:

- 20 5'-ATGGGAGCAG GAGCAACCGG AAGGGCAATG GACGGACCAC GGCTGCTGCT GCTGCTGCTG
CTGGGCGTGA GCCTGGGCGG CGCCCGGAGC TGGATGGAGT GGGACCGGGA GATCAACAAC
TACACCAGCC TGATCCACAG CCTGATCGAG GAGAGCCAGA ACCAGCAGGA GAAGAACGAG
CAGGAGCTGC TGGAGCTGGA CAAGTGGGCC AGCCTGTGGA ACTGGTTCCG GAGCGAGCGG
AAGTGCTGCG TGGAGTGCCC ACCATGCCCA GCACCACCAG TGGCAGGACC CCTGATCGCA
CTGGTGACCA GCGGAGCCCT GCTGGCCGTG CTGGGCATCA CAGGCTACTT CCTGATGAAC
CGGCGGAGCT GGAGCCCCAC CGGCGAGCGG CTGGAGCTGG AGCCCTGA-3' (SEQ ID NO: 3).

- 25 Otras proteínas adecuadas que inhiben la fusión del VIH a una célula diana y que pueden codificarse por la segunda secuencia de ácido nucleico en los vectores de expresión de la invención incluyen T20 y sus proteínas relacionadas, enfuvirtida, CP₃₂M, y sifuvirtida.

- 30 En determinadas realizaciones, la segunda secuencia de ácido nucleico codifica una proteína que inhibe la replicación del VIH. En algunas realizaciones, la proteína que inhibe la replicación del VIH es un motivo tripartito que contiene proteína 5 alfa (TRIM5α) o derivados o fusiones de la misma. Por ejemplo, la segunda secuencia de ácido nucleico puede codificar una TRIM5α humana, TRIM5α de mono rhesus, una TRIM5α quimérica, o una proteína de fusión de TRIM5-ciclofilina humana. En una realización, la segunda secuencia de ácido nucleico codifica una proteína TRIM5α humana que comprende una secuencia de:

- 35 MASGILVNVK EEVTOPICLE LLTQPLSLDC GHSFCQACLT ANHKKSMLDK GESSCPVCRI
SYQPENIRPN RLVANIVEKL REVKLSPEGQ KVDHRCARHGE KLLLFCQEDG KVICWLCERS
QEHRGHHTFL TEEVAREYQV KLOAALEMLR QKQOEAELE ADIREEKASW KTQIQYDKTN
VLADFEQLRD ILDWEESENL QNLEKEEEDI LKSLTNSETE MVQQTQSLRE LISDLEHRLQ
GSVMELLQGV DGVIKRTENV TLKKPETFPK NQRRVFRAPD LKGMLEVFRE LTDVRRYVWD
VTVAPNNISC AVISEDKRQV SSPKPQIIYG ARGTRYQTFV NFNYCTGILG SQSITSGKHY
WEVDVSKKTA WILGVCAGFQ PDAMCNIEKN ENYQPKYGYW VIGLEEGVKC SAFQDSSFHT
PSVFFIVPLS VIICPDRVGV FLDYEAQTVS FFNITNHGFL IYKFSHCSPS QPVFPYLNPR
KCGVPMILCS PSS (SEQ ID NO: 4).

En otra realización, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de:

5'-ATGGCTTCTG GAATCCTGGT TAATGTAAAG GAGGAGGTGA CCTGCCCCAT CTGCCTGGAA
 CTCCTGACAC AACCCCTGAG CCTGGACTGC GGCCACAGCT TCTGCCAAGC ATGCCTCACT
 GCAAACCACA AGAAGTCCAT GCTAGACAAA GGAGAGAGTA GCTGCCCTGT GTGCCGGATC
 AGTTACCAGC CTGAGAACAT ACGGCCTAAT CGGCATGTAG CCAACATAGT GGAGAAGCTC
 AGGGAGGTCA AGTTGAGCCC AGAGGGGCAG AAAGTTGATC ATTGTGCACG CCATGGAGAG
 AAACTECTAC TCTTCTGTCA GGAGGACGGG AAGGTCATTT GCTGGCTTTCG TGAGCGGTCT
 CAGGAGCACC GTGGTCACCA CACGTTCCCTC ACAGAGGAGG TTGCCCGGGA GTACCAAGTG
 AAGCTCCAGG CAGCTCTGGA GATGCTGAGG CAGAAGCAGC AGGAAGCTGA AGAGTTAGAA
 GCTGACATCA GAGAAGAGAA AGCTTCCTGG AAGACTCAA TACAGTATGA CAAAACCAAC
 GTCTTGGCAG ATTTTGAGCA ACTGAGAGAC ATCCTGGACT GGGAGGAGAG CAATGAGCTG
 CAAAACCTGG AGAAGGAGGA GGAAGACATT CTGAAAAGCC TTACGAACTC TGAAACTGAG
 ATGGTGCAGC AGACCCAGTC CCTGAGAGAG CTCATCTCAG ATCTGGAGCA TCGGCTGCAG
 GGGTCAGTGA TGGAGCTGCT TCAGGGTGTG GATGGCGTCA TAAAAAGGAC GGAGAACGTG
 ACCTTGAAGA AGCCAGAAAC TTTTCCAAAA AATCAAAGGA GAGTGTTCG AGCTCCTGAT
 CTGAAAGGAA TGCTAGAAGT GTTTAGAGAG CTGACAGATG TCCGACGCTA CTGGGTTGAT
 GTGACAGTGG CTCCAAACAA CATTTTATGT GCTGTCAATTT CTGAAGATAA GAGACAAGTG
 AGCTCTCCGA AACCCAGAT AATATATGGG GCACGAGGGA CAAGATACCA GACATTTGTG
 AATTTCAATT ATTGFACTGG CATCCTGGGC TCTCAAAGTA TCACATCAGG GAAACATTAC
 TGGGAGGTAG ACGTGTCCAA GAAAACCTGCT TGGATCCTGG GGGTATGTGC TGGCTTCCAA
 CCTGATGCAA TGTGTAATAT TGAAAAAAT GAAAATTATC AACCTAAATA CGGCTACTGG
 GTTATAGGGT TAGAGGAAGG AGTTAAATGT AGTGCTTTC AGGATAGTTC CTTCCTACT
 CCTTCTGTTT CTTTCATTGT GCCCCTCTCT GTGATTAATTT GTCTTGATCG TGTGGAGTT
 TTCTAGACT ATGAGGCTTG CACTGTCTCA TTCTTCAATA TCACAAACCA TGGATTTCTC
 ATCTATAAGT TTTCTCACTG TTTTCTTCT CAGCCGTGAT TTCCATATTT AAATCCTAGA
 AAATGTGGAG TCCCATGAC TCTGTGCTCA CCAAGCTCTT GA-3' (SEQ ID NO: 5).

5 Una "TRIM5α quimérica" se refiere a una proteína TRIM5α que comprende dominios o fragmentos de proteínas TRIM5α de dos o más especies. Por ejemplo, una TRIM5α puede comprender al menos un dominio de una TRIM5α humana y al menos un dominio de una TRIM5α de mono rhesus. En algunas realizaciones, una proteína TRIM5α quimérica comprende un dominio amino terminal de una proteína TRIM5α humana y un dominio PRYSPRY carboxilo terminal de una proteína TRIM5α de mono rhesus.

10 En otra realización, la segunda secuencia de ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende TRIM5α y ciclofilina. Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión de TRIM5-ciclofilina comprende los aminoácidos 1 a aproximadamente 309 de TRIM5α humana fusionados directamente a la ciclofilina A humana de aproximadamente longitud completa. En otra realización, la proteína de fusión de TRIM5-ciclofilina comprende los aminoácidos 1 a aproximadamente 322 de TRIM5α humana fusionados directamente a la ciclofilina A humana de aproximadamente longitud completa. En otra realización más, la proteína de fusión de TRIM5-ciclofilina comprende los aminoácidos 1 a aproximadamente 331 de TRIM5α humana fusionados directamente a la ciclofilina A humana de aproximadamente longitud completa. Otras proteínas adecuadas que inhiben la replicación del VIH que pueden codificarse por la segunda secuencia de ácido nucleico incluyen, pero sin limitación, ciclofilina, ubiquitina E3, APOBEC3G, antígeno celular estromal de médula ósea 2 (BST-2).

Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención incluyen además secuencias de ácido nucleico que

codifican variantes conservativas de equivalentes funcionales de las proteínas descritas en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, una variante conservativa se refiere a alteraciones en la secuencia de aminoácidos que no afectan de manera negativa a las funciones biológicas de la proteína. Se dice que una sustitución, inserción o eliminación afecta de manera negativa a la proteína cuando la secuencia alterada evita o altera una función biológica asociada a la proteína. Por ejemplo, la carga general, la estructura o las propiedades hidrófobas/hidrófilas de la proteína pueden alterarse sin afectar negativamente a una actividad biológica. Por consiguiente, puede alterarse la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, para hacer que la proteína sea más hidrófoba o hidrófila, sin afectar negativamente a las actividades biológicas de la proteína.

Comúnmente, las variantes de sustitución conservativa y los equivalentes funcionales de las proteínas tendrán una identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias divulgadas de SEQ ID NO: 2 y 4 de al menos aproximadamente un 55 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, o de al menos aproximadamente el 96 % al 99 %. La identidad u homología con respecto a dichas secuencias se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los péptidos conocidos, después de alinear las secuencias e introducir los huecos, en caso necesario, para lograr el máximo porcentaje de homología, y sin tener en cuenta las posibles sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. No debe entenderse que las extensiones, eliminaciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas en la secuencia peptídica afecten a la homología.

Por lo tanto, las secuencias de ácido nucleico de los vectores de expresión de la presente invención pueden codificar variantes conservativas o equivalentes funcionales de las secuencias de proteína descritas en el presente documento. Las variantes contempladas incluyen además aquellas que contienen mutaciones predeterminadas mediante, por ejemplo, recombinación de homólogos, mutagénesis de sitio dirigido o por PCR, y las proteínas correspondientes de otras especies animales, incluyendo, pero sin limitación, de conejo, rata, porcinas, bovinas, ovinas, equinas y especies de primates no humanos.

En algunas realizaciones de los vectores de expresión de la invención, la primera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de un correceptor de VIH está unida operativamente a un primer promotor y la segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que inhibe la fusión del VIH a una célula diana o replicación de VIH está unida operativamente a un segundo promotor. En determinadas realizaciones de la invención en las que el vector de expresión comprende tres secuencias de ácido nucleico, cada una de las tres secuencias de ácido nucleico pueden estar unidas operativamente a un promotor diferente. Por ejemplo, en una realización, la primera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de un correceptor de VIH está unida operativamente a un primer promotor, la segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que inhibe la fusión del VIH a una célula diana está unida a un segundo promotor, y la tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que inhibe la replicación del VIH está unida operativamente a un tercer promotor. En otras realizaciones, se transcriben dos de las tres secuencias de ácido nucleico a partir de un solo promotor (es decir, la primera y la segunda secuencia de ácido nucleico o la segunda y la tercera secuencia de ácido nucleico). En otras realizaciones adicionales, las tres secuencias de ácido nucleico se transcriben a partir de un solo promotor. Los tres promotores pueden ser iguales o distintos entre sí.

La expresión "unida operativamente" o "bajo el control transcripcional", tal como se usa en el presente documento, significa que el promotor está en la ubicación y orientación correcta en relación a una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa y la expresión del ácido nucleico. Los promotores seleccionados carecen preferentemente de exclusión de promotor, evitando de este modo que un promotor anule a los demás promotores. El primer, segundo, y tercer promotor pueden ser promotores de ARN polimerasa 1 (pol I), polimerasa II (pol II) o polimerasa III (pol III). Los promotores pueden ser promotores constitutivos o promotores inducibles. Los promotores inducibles se conocen en la técnica y pueden incluir el promotor de tetraciclina, el promotor de metalotioneína IIA, el promotor de choque térmico, elementos de respuesta a esteroides/hormona tiroidea/ácido retinoico, el promotor tardío de adenovirus, y el LTR de virus de tumor mamario de ratón inducible. En una realización, el promotor contiene al menos una porción de un LTR de VIH (por ejemplo, TAR) y es inducible mediante infección por VIH. En determinadas realizaciones, el primer promotor es un promotor de ARN pol III. Los promotores de ARN pol III adecuados para su uso en los vectores de expresión de la invención incluyen, pero sin limitación, a U6 humano, U6 de ratón, y H1 de ser humano. En una realización, el primer promotor es un promotor H1 de ARN pol III. En otras realizaciones, el segundo promotor es un promotor de ARN pol II. En una realización particular, el segundo promotor es un promotor de ubiquitina C pol II. El segundo promotor, en algunas realizaciones, puede ser un promotor específico de tejido. Por ejemplo, los promotores específicos de tejido adecuados incluyen promotores específicos de macrófagos (por ejemplo, MPG-1 y similares) y promotores de linfocitos T (por ejemplo, CD4 y similares). En una realización, el tercer promotor es un promotor de ARN pol I. En otra realización, el tercer promotor es un promotor de ubiquitina C pol II. El tercer promotor puede ser, en algunas realizaciones, un promotor específico de tejido. El primer, el segundo y el tercer promotor pueden ser una combinación de cualquiera de los promotores descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, se prefieren los promotores de ARN pol III, donde la secuencia de ácido nucleico codifica una molécula de ARN inhibidora, tal como un ARNpi o ARNh. En otras realizaciones, se prefieren promotores de ARN pol II donde la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína. En las realizaciones en las que el inhibidor del correceptor de VIH es una molécula de ARNpi, puede usarse más de un

promotor para generar la molécula de ARNpi. Por ejemplo, en una realización, el vector de expresión comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la hebra sentido de la molécula de ARNpi y otra molécula de ácido nucleico que codifica la hebra antisentido de la molécula de ARNpi, de tal forma que se forma el dúplex de ARNpi después de la expresión de los dos ácidos nucleicos. En dichas realizaciones, el vector de expresión puede comprender un primer promotor de Pol III unido operativamente al primer ácido nucleico que codifica la hebra sentido y un segundo promotor de Pol III unido operativamente al segundo ácido nucleico que codifica la hebra antisentido. En otra realización, el vector de expresión comprende un primer promotor de ARN Pol III unido operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de ARNpi que se dirige al correceptor de VIH, y un segundo promotor de ARN pol III unido operativamente a la misma primera secuencia de ácido nucleico en la dirección contraria, de tal forma que la expresión de la primera secuencia de ácido nucleico a partir del primer promotor de ARN Pol III da como resultado una síntesis de la hebra sentido de la molécula de ARNpi y la expresión de la primera secuencia de ácido nucleico a partir del segundo promotor de ARN Pol III da como resultado la síntesis de la hebra antisentido de la molécula de ARNpi. Después de la expresión de la primera secuencia de ácido nucleico a partir de los dos promotores diferentes, las hebras sentido y antisentido hibridan para formar el dúplex de ARNpi.

En una realización, la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico se transcriben a partir de un solo promotor. Por ejemplo, la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico se unen operativamente a un promotor, de tal forma que se genera un solo transcrito. En otra realización, se ubica un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) cadena arriba de la segunda secuencia de ácido nucleico y cadena abajo de la primera secuencia de ácido nucleico. En otras realizaciones en las que el vector de expresión comprende tres secuencias de ácido nucleico, se transcriben dos de las tres secuencias de ácido nucleico a partir de un solo promotor (es decir, la primera y la segunda secuencia de ácido nucleico o la segunda y la tercera secuencia de ácido nucleico). En otras realizaciones adicionales, las tres secuencias de ácido nucleico se transcriben a partir de un solo promotor. Puede haber presentes uno o más elementos IRES cadena arriba de la segunda y/o tercera secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, en una realización, la primera, la segunda y la tercera secuencia de ácido nucleico pueden unirse operativamente a un solo promotor y puede situarse un primer elemento IRES entre la primera y la segunda secuencia de ácido nucleico y puede situarse un segundo elemento IRES entre la segunda y la tercera secuencia de ácido nucleico. Los elementos IRES permiten una traducción eficaz de mensajes policistrónicos. Puede usarse cualquier elemento IRES conocido en la técnica en las construcciones de expresión de la invención.

En determinadas realizaciones, la primera y la segunda secuencia de ácido nucleico se expresan en diferentes proporciones, de tal forma que la expresión del inhibidor del correceptor de VIH puede ser mayor que la del inhibidor de la replicación o de la fusión del VIH. Por ejemplo, la proporción de la expresión de la primera secuencia de ácido nucleico a la segunda secuencia de ácido nucleico puede ser desde aproximadamente 2:1 a más de aproximadamente 10:1, preferentemente de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10:1, más preferentemente de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1. En una realización, la proporción de expresión de la primera secuencia de ácido nucleico a la segunda secuencia de ácido nucleico es de aproximadamente 2:1. En las realizaciones en las que el vector de expresión comprende tres secuencias de ácido nucleico, la relación de expresión de la primera, la segunda y la tercera secuencia de ácido nucleico puede manipularse, de tal forma que la expresión de inhibidores de correceptor de VIH será mayor que la de los inhibidores de la replicación y la fusión de VIH. Por ejemplo, en realizaciones en las que la primera secuencia de ácido nucleico codifica un inhibidor de un correceptor de VIH (por ejemplo, CCR5 o CXCR4), la segunda secuencia de ácido nucleico codifica un inhibidor de la fusión, y la tercera secuencia de ácido nucleico codifica un inhibidor de la replicación, la relación de expresión de la primera, segunda y tercera secuencia de ácido nucleico puede ser desde aproximadamente 2:1:1 a aproximadamente 10:1:1, desde aproximadamente 5:1:1 a aproximadamente 10:1:1, o desde aproximadamente 2:1:1 a aproximadamente 5:1:1.

La generación de los vectores de expresión descritos en el presente documento puede lograrse usando cualquier técnica de ingeniería genética bien conocida en la técnica, incluyendo, sin limitación, las técnicas convencionales de PCR, síntesis de oligonucleótidos, digestión de endonucleasa de restricción, ligamiento, transformación, purificación de plásmido, y secuenciación de ADN, por ejemplo, tal como se describe en Sambrook et al., (Molecular Cloning-A Laboratory Manual (3ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., (2000)), Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc.), Coffin et al. (Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1997)) y "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000)).

En una realización, el vector de expresión es un vector FG12, y más preferentemente un vector lentivírico FG11F (véase el Ejemplo 1). En otra realización, la segunda secuencia de ácido nucleico se clona en dos sitios de restricción (por ejemplo, BamHI y EcoRI del vector FG11F). En otra realización más, la primera secuencia de ácido nucleico se inserta entre dos sitios de restricción (por ejemplo, los sitios XbaI/XhoI del vector FG11F). En determinadas realizaciones, el vector de expresión viral comprende además al menos una molécula de ácido nucleico adicional capaz de inhibir la infección por VIH, seleccionada entre un ARNhc o ARNpi, una molécula antisentido, una ribozima o un aptámero dirigido a una secuencia viral de VIH o secuencia hospedadora. En otras realizaciones, el vector de expresión viral comprende además una o más secuencias de ácido nucleico codificantes de proteínas tal como se describen en el presente documento. Por ejemplo, en una realización, el vector de expresión viral comprende además una o más secuencias de ácido nucleico que codifican inhibidores proteicos de la replicación del VIH. Los vectores de expresión, tal como se definen en las reivindicaciones, confieren resistencia a la infección por más de

una variante de VIH cuando se expresan en las células hospedadoras. En una realización, los nuevos vectores de expresión, cuando se expresan en células hospedadoras, confieren resistencia a la infección por las cepas trópicas R5 y X4 de VIH. En algunas realizaciones, cuando se expresan en células hospedadoras, los vectores de expresión confieren resistencia a la infección por cepas de VIH que son resistentes a las terapias HAART o Maraviroc.

5 La presente divulgación también incluye un método para producir un vector de expresión viral que es capaz de inhibir la unión del VIH a la célula y evitar la fusión del VIH a la célula o la replicación del VIH cuando se expresan en una célula hospedadora. En un aspecto, el método comprende sintetizar un ADNc de un gen que expresa una proteína capaz de evitar la fusión del VIH en una célula o la replicación del VIH; clonar el ADNc sintetizado en un sitio de restricción en un vector viral; e insertar una unidad de expresión capaz de regular negativamente la expresión de un correceptor de VIH en un sitio de restricción en el vector. El ADNc puede ser de cualquier gen que exprese cualquiera de las proteínas inhibitoras de la fusión o la replicación descritas en el presente documento. Por ejemplo, en una realización, el ADNc es un ADNc de C46. En otras realizaciones, el ADNc es un ADNc de TRIM5 α o una fusión con ciclofilina de la misma. La unidad de expresión capaz de regular negativamente la expresión de un correceptor de VIH puede ser cualquiera de las moléculas de ARN inhibitoras descritas en el presente documento, tales como ARNip, ARNhp, o antisentido que se dirigen al correceptor. En una realización, la unidad de expresión es un ARNhp que se dirige a CCR5. En una realización particular, el ARNhp que se dirige a CCR5 tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1.

20 El vector vírico puede ser un vector retrovírico. En determinadas realizaciones, el vector retrovírico es un vector lentivírico, tal como el vector lentivírico FG11F. En algunas realizaciones, el ADNc de un gen que codifica una proteína inhibitora de la fusión o la replicación se clona en los sitios de restricción BamHI y EcoRI de un vector FG11F. En otras realizaciones, la unidad de expresión capaz de regular negativamente la expresión de un correceptor de VIH se inserta entre los sitios de restricción XbaI/XhoI del vector FG11F. Los expertos habituales en la materia conocen otros vectores lentivíricos y sitios de restricción adecuados para su uso en el método.

25 La presente invención también proporciona una célula hospedadora que comprende los nuevos vectores de expresión de la invención. Una "célula hospedadora" o "célula diana" significa una célula que se va a transformar usando los métodos y vectores de expresión de la invención. En algunas realizaciones, las células hospedadoras son células de mamífero en las que puede expresarse el vector de expresión. Las células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen, pero sin limitación, células humanas, células murinas, células de primates no humanos (por ejemplo, células de mono rhesus), células progenitoras o células madre humanas, células 293, células HeLa, células D17, células MDCK, células BHK y células Cf2Th. En determinadas realizaciones, la célula hospedadora que comprende un vector de expresión de la invención es una célula hematopoyética, tal como una célula progenitora/madre hematopoyética (por ejemplo, una célula progenitora/madre hematopoyética positiva a CD34 (HPSC)), un monocito, un macrófago, una célula mononuclear de sangre periférica, un linfocito T Cod4+, un linfocito T CD8+, o una célula dendrítica. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula hematopoyética CCR5+. En otras realizaciones, la célula hospedadora puede ser una célula hospedadora de un paciente o emparejada a un paciente. En determinadas realizaciones, una célula hospedadora transducida con los vectores de expresión de la invención es resistente a la infección por cepas trópicas de VIH X4 o R5, incluyendo cepas resistentes a HAART.

40 Los métodos para administrar vectores de expresión y ácidos nucleicos a células se conocen en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, infección vírica, co-precipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, DEAE-dextrano, lipofección, transfección empleando reactivos de transfección de poliamina, sonicación celular, bombardeo génico usando microproyectiles de alta velocidad, y transfección mediada por receptores.

45 La presente invención también abarca una composición farmacéutica que comprende los nuevos vectores de expresión de la invención. En una realización, la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de al menos uno de los vectores de expresión tal como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de un vector de expresión y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicho vector de expresión comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de un correceptor de VIH y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que inhibe la fusión del VIH a una célula diana o replicación de VIH, tal como se describe en el presente documento.

50 Las expresiones "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades y composiciones moleculares que no producen reacciones adversas, alérgicas, u otras desfavorables cuando se administran a un animal o a un ser humano. Tal como se usa en el presente documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, tampones, soluciones, medios de dispersión, recubrimientos, agente antibacteriano y antifúngico, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares aceptables para su uso en la formulación de agentes farmacéuticos, tales como agente farmacéutico adecuado para su administración a seres humanos. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en los casos donde cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los vectores de expresión de la presente invención, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para su administración mediante diversas rutas de administración incluyendo, pero sin limitación, oral, nasal, bucal, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o inyección intravenosa. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma de supositorios

para administración rectal. Pueden incorporarse también principios activos suplementarios en las composiciones, siempre que no inactiven a los vectores o polinucleótidos de las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas. A modo ilustrativo, las soluciones de los principios activos en forma de bases libres o sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse en agua mezclados de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen generalmente un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen, por ejemplo, soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En general, estas preparaciones son estériles y fluidas hasta el punto de que son fácilmente inyectables. Las preparaciones deben ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben conservarse contra la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. Los disolventes o medios de dispersión adecuados pueden contener, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse por medio de varios agentes antibacterianos y anti fúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando los compuestos activos en una cantidad adecuada en un disolvente junto con cualquier otro ingrediente (por ejemplo, tal como se han enumerado anteriormente) según se desee, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los varios principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los otros ingredientes deseados, por ejemplo, tal como se han enumerado anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación incluyen técnicas de secado al vacío y de criodeseccación que producen un polvo de los principios activos más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución esterilizada por filtración de los mismos.

La composición de la presente invención puede formularse generalmente en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) derivadas de ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico), o a partir de ácidos orgánicos (por ejemplo, acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares). Las sales formadas con los grupos carboxilo libres de la proteína también pueden derivarse de bases inorgánicas (por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos) o de bases orgánicas (por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares).

La presente solicitud describe un método para tratar o prevenir la infección por VIH en un paciente que lo necesite. Tal como se usa en el presente documento, un "paciente" o "sujeto" puede abarcar cualquier vertebrado, incluyendo, pero sin limitación, seres humanos y mamíferos. Sin embargo, ventajosamente, el paciente o sujeto es un mamífero, tal como un ser humano o un primate no humano, o un mamífero, tal como un mamífero domesticado, por ejemplo, perro, gato, caballo y similares, o un animal de producción, por ejemplo, vaca, oveja, cerdo, y similares. En los casos donde el paciente es distinto de un ser humano, la invención proporciona un método para tratar o prevenir una infección relacionada con el VIH en el paciente (por ejemplo, infección por VIS, VIF, o VIB). En una realización preferida, el paciente es un ser humano.

En una realización, el método comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión de la invención, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el método comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión en el que dicho vector de expresión comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un ARNhc que se dirige a CCR5 (o CXCR4) y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína C46, y opcionalmente en el que dicha primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a un primer promotor y dicha segunda secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a un segundo promotor, tal como se ha descrito. En otras realizaciones, el método comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión en el que dicho vector de expresión comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un ARNhc que se dirige a CCR5 (o CXCR4) y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína TRIM5 α o un derivado o fusión de la misma, y opcionalmente en el que dicha primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a un primer promotor y dicha segunda secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a un segundo promotor, tal como se ha descrito. En otras realizaciones más, el método comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión en el que dicho vector de expresión comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de un correceptor de VIH (por ejemplo, ARNhc para CCR5 o CXCR4), una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de la fusión (por

ejemplo, C46), y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de la replicación del VIH (por ejemplo, proteína TRIM5 α o un derivado o fusión de la misma), opcionalmente en el que dichas primera, segunda y tercera secuencia de ácido nucleico están unidas operativamente a un primer, segundo y tercer promotor, tal como se describe en el presente documento. En otra realización, el método comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión en el que dicho vector de expresión comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer inhibidor de un correceptor de VIH (por ejemplo, ARNhc para CCR5), una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo inhibidor de un correceptor de VIH (por ejemplo, ARNhc para CXCR4), y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de la fusión viral del VIH a una célula diana o de la replicación del VIH, opcionalmente en el que dichas primera, segunda y tercera secuencia de ácido nucleico están unidas operativamente a un primer, segundo y tercer promotor, tal como se describe en el presente documento.

En determinadas realizaciones, el paciente al que se administra la composición farmacéutica es un paciente en riesgo de infección por las cepas trópicas R5 y X4 del VIH, incluyendo cepas resistentes a HEART, y dicho riesgo se reduce después de la administración de la composición. En algunas realizaciones, el paciente es negativo a VIH. En otras realizaciones, el paciente (por ejemplo, un ser humano) puede ser positivo a VIH y no haber estado expuesto previamente a terapia antirretroviral elevadamente activa (HAART), es decir, el paciente no ha recibido nunca HAART, que incluye combinaciones de inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, inhibidores de la proteasa, e inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos. En algunas realizaciones, el paciente está recibiendo un régimen de HAART. En otras realizaciones adicionales, el paciente está fracasando o ha fracasado en un régimen HAART (es decir, la HAART es ineficaz para reducir la carga viral debido a la resistencia). Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el vector de expresión se introduce directamente al paciente bien de manera profiláctica para un paciente que es negativo a VIH o para tratar a un paciente que es positivo a HIP.

Los vectores de expresión de las composiciones pueden modificarse de tal forma que se localicen específicamente en tipos celulares particulares, tales como células inmunes. A modo de ejemplo, el vector de expresión puede combinarse con un vehículo de direccionamiento génico mediado por receptor, en el que dicho vehículo comprende un ligando específico de receptor celular y un agente de unión a ADN. Como alternativa, puede unirse un ligando específico de receptor a un liposoma que comprende el vector de expresión. Los ligandos específicos de receptor pueden seleccionarse dependiendo de los tipos celulares de interés. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el vector de expresión puede localizarse en células CD34+ empleando un ligando que se une al marcador de la superficie celular CD34. Un experto en la técnica puede seleccionar ligandos adecuados para dirigirse a tipos celulares específicos, tales como células inmunitarias (por ejemplo, un monocito/macrófago, una célula mononuclear de sangre periférica, un linfocito T CD4+, un linfocito T CD8+, o una célula dendrítica). En determinadas realizaciones en las que el vector de expresión es un vector viral, el vector viral puede empaquetarse en partículas virales que tienen un tropismo particular por determinados tipos celulares. Por ejemplo, en una realización, el vector viral se empaqueta en partículas retrovirales de VIH, permitiendo de este modo que el retrovirus recombinante infecte a linfocitos T CD4+ y macrófagos.

La administración a un paciente de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención puede ser a través de cualquier ruta convencional siempre que el tejido diana esté disponible a través de esa ruta. Esto incluye oral, nasal o bucal. Como alternativa, la administración puede ser mediante inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa. En una realización, la composición farmacéutica puede administrarse por vía rectal con un supositorio. Tras la formulación, las soluciones se administran preferentemente de un modo compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones pueden administrarse fácilmente en diversas formas de administración, tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco y similares. Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se tampona generalmente de manera adecuada y el diluyente líquido se hace en primer lugar isotónico, por ejemplo, con suficiente solución salina o glucosa. Dichas soluciones acuosas pueden usarse, por ejemplo, para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Preferentemente, se emplean medios acuosos estériles como se conoce por los expertos en la técnica, particularmente a la luz de la presente divulgación. A modo ilustrativo, puede disolverse una sola dosis en 1 ml de solución isotónica de NaCl y bien añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Puede haber cierta variación en la dosificación dependiendo del estadio de la infección por VIH en el paciente que se esté tratando. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis adecuada para el paciente individual. Además, para administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir patrones de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza, tal como requiere la Agencia de Patrones biológicos de la FDA.

En otra realización, la presente solicitud describe un método para tratar o prevenir la infección por VIH en un paciente administrando al paciente células hematopoyéticas resistentes al VIH producidas transduciendo las células con un vector de expresión de la invención. Por ejemplo, en una realización, el método comprende transducir células hematopoyéticas *ex vivo* con un vector de expresión descrito en el presente documento, e infundir las células transducidas al paciente. Puede administrarse una o más infusiones de las células transducidas al paciente. En algunas realizaciones, el paciente recibe múltiples infusiones de las células transducidas a lo largo de un intervalo periódico, tal como semanalmente, bisemanalmente, mensualmente, trimestralmente o anualmente. En una realización, el paciente recibe una infusión de las células transducidas cada dos semanas. Las células

hematopoyéticas adecuadas para su uso en el método incluyen, pero sin limitación, células progenitoras/madre hematopoyéticas (HPSC), monocitos, macrófagos, células mononucleares de sangre periférica, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, y células dendríticas. En una realización, las células hematopoyéticas usadas en el método son linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ o monocitos/macrófagos. En una realización preferida, las células hematopoyéticas usadas en el método son HPSC. Tal como se usa en el presente documento, las células hematopoyéticas transducidas incluyen las células transducidas en sí así como células derivadas de las células transducidas (por ejemplo, células generadas a partir de HPSC transducidas).

Por lo tanto, en una realización particular, la presente solicitud describe un método para tratar o prevenir la infección por VIH en un paciente reconstituyendo el sistema inmune con células resistentes al VIH generadas a partir de HPSC transducidas. Por ejemplo, en una realización, el método comprende transducir HPSC con un vector de expresión, tal como se describe en el presente documento, y trasplantar dichas HPSC transducidas al paciente, en el que dichas células trasplantadas generan granulocitos, monocitos/macrófagos, y linfocitos que son resistentes a la infección por VIH. Los granulocitos, monocitos/macrófagos, y linfocitos son resistentes a la infección por las cepas trópicas R5 y X4 de VIH. En algunas realizaciones, los granulocitos, monocitos/macrófagos, y linfocitos son resistentes a la infección por cepas de VIH que son resistentes a la HAART. El paciente puede ser negativo a VIH o positivo a VIH. En una realización, el paciente humano no se ha expuesto previamente a terapia antirretroviral elevadamente activa (HAART). En otra realización, el paciente está recibiendo un régimen de HAART. En otra realización más, el paciente está fracasando o ha fracasado en un régimen HAART.

Las células hematopoyéticas (por ejemplo, HPSC, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, y/o monocitos/macrófagos) que se van a transducir con un vector de expresión de la invención pueden ser alogénicas o autólogas. "Células alogénicas" se refieren a células obtenidas a partir de individuos diferentes de la misma especie. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "células autólogas" se refiere a células aisladas a partir de un paciente que posteriormente se reimplantan o inyectan en el mismo paciente. Por lo tanto, un trasplante autólogo es uno en el que el donante y receptor son el mismo paciente. En determinadas realizaciones, las células hematopoyéticas son HPSC autólogas. Los HPSC son preferentemente positivos a CD34 y pueden aislarse a partir de la médula ósea o la sangre periférica del paciente. Los métodos para dicha purificación se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N°: 4.965.204, 4.714.680, 5.061.620, 5.643.741, 5.677.136, 5.716.827, 5.750.397, y 5.759.793). Por ejemplo, un método para purificar dichas células madre positivas a CD34 implica centrifugación de muestras de sangre periférica para separar células mononucleadas y granulocitos, seguido de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para seleccionar células CD34+. En una realización, las células se enriquecen respecto de células CD34+ mediante una tecnología de separación magnética, tal como aquella disponible de Miltenyi Biotec, y que se ha descrito previamente (Kogler et al., (1998) Bone Marrow Transplant., Vol. 21:233-241; Pasino et al. (2000) Br. J. Haematol., Vol. 108: 793-800). Las células positivas a CD34 pueden mobilizarse desde la médula hacia la sangre antes de la recolección inyectando al paciente una o más citocinas conocidas que movilizan las células madre hematopoyéticas, tale como factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de granulocitos y macrófagos, y factor de células madre.

Las HPSC positivas a CD34 (y/o otra célula hematopoyética descrita en el presente documento) se transducen preferentemente con un vector de expresión de la invención. Por ejemplo, en una realización, el vector de expresión comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de un correceptor de VIH y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que inhibe la fusión del VIH a una célula diana o replicación de VIH, opcionalmente en el que dicha primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a un primer promotor y dicha segunda secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a un segundo promotor. En otra realización, el vector de expresión comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de un correceptor de VIH, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de la fusión, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de la replicación del VIH, opcionalmente en el que dichas primera, segunda y tercera secuencia de ácido nucleico están unidas operativamente a un primer, segundo y tercer promotor. En otra realización adicional más, el vector de expresión comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer inhibidor de un correceptor de VIH, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo inhibidor de un correceptor de VIH, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de la fusión vírica del VIH a una célula diana o replicación de VIH, opcionalmente en el que dichas primera, segunda y tercera secuencia de ácido nucleico están unidas operativamente a un primer, segundo y tercer promotor.

En una realización, la primera secuencia de ácido nucleico (o segunda secuencia de ácido nucleico en realizaciones en las que el vector de expresión comprende tres secuencias de ácido nucleico) codifica un ARNip o ARNhp que tiene una región bicatenaria, en el que la región bicatenaria comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica y complementaria a una secuencia de CCR5. En otra realización, la primera secuencia de ácido nucleico codifica un ARNhp que se dirige a CCR5 que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1. En otra realización, la primera secuencia de ácido nucleico codifica un ARNip o ARNhp que tiene una región bicatenaria, en el que la región bicatenaria comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica y complementaria a una secuencia de CXCR4. En realizaciones particulares, las células hematopoyéticas transducidas (por ejemplo, HPSC, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, y/o monocitos/macrófagos) o células generadas a partir de estas expresan niveles reducidos de una proteína correceptora de VIH (por ejemplo, CCR5 o CXCR4) en comparación con células hematopoyéticas no transducidas. Por ejemplo, las células hematopoyéticas transducidas o células generadas a partir de estas pueden expresar un 30 %, 40 %, 50 %, 60

5 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 % menos de proteína correceptora de VIH en comparación con células hematopoyéticas no transducidas. En otras realizaciones, las células hematopoyéticas se transducen con un vector de expresión de la invención en el que la segunda secuencia de ácido nucleico (o tercera secuencia de ácido nucleico en realizaciones en las que el vector de expresión comprende tres secuencias de ácido nucleico) codifica una proteína TRIM5 α o un derivado o fusión de la misma, tal como TRIM5 α humana, TRIM5 α de mono rhesus, TRIM5 α quimérica, o una proteína de fusión de TRIM5-ciclofilina humana. En otras realizaciones adicionales, las células hematopoyéticas se transducen con un vector de expresión de la invención en el que la segunda secuencia de ácido nucleico (o tercera secuencia de ácido nucleico en realizaciones en las que el vector de expresión comprende tres secuencias de ácido nucleico) codifica una proteína C46. En dichas realizaciones, la célula o células hematopoyéticas transducidas generadas a partir de estas expresan niveles aumentados de la proteína (por ejemplo, C46 o TRIM5 α o un derivado o fusión de las mismas) en comparación con células hematopoyéticas no transducidas, es decir, un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, o más de un 200 % más de la proteína codificada en comparación con células hematopoyéticas no transducidas.

15 Después de la transducción de las células hematopoyéticas (por ejemplo, HPSC, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, o monocitos/macrófagos) con un vector de expresión de la invención, las células transducidas se reintroducen o trasplantan de nuevo al paciente. Las células transducidas pueden inyectarse por vía parenteral al paciente, o reintroducirse mediante cualquier otra ruta conocida en la técnica. En una realización, las células hematopoyéticas transducidas se inyectan por vía intravenosa al paciente. Preferentemente, se administra al paciente una dosis eficaz de células hematopoyéticas transducidas. Una "dosis eficaz" es una cantidad suficiente para producir un resultado clínico beneficioso o deseado y puede depender del tipo de célula hematopoyética usada. En una realización, la célula hematopoyética es una HPSC y una dosis eficaz es una cantidad que es suficiente para reconstituir al menos parcialmente el sistema inmunitario con células resistentes al VIH. Dicha dosis puede administrarse en una o más administraciones y puede ser desde aproximadamente $0,5 \times 10^6$ HPSC por kg de peso del paciente hasta aproximadamente 1×10^9 HPSC por kg de peso del paciente. En otra realización, la célula hematopoyética es un linfocito T CD4+, un linfocito T CD8+ o un monocito/macrófago y una dosis eficaz puede ser desde aproximadamente 1×10^9 células por paciente hasta 1×10^{11} células por paciente. Sin embargo, la determinación precisa de qué se consideraría una dosis eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, incluyendo su tamaño, edad, gravedad de la infección por VIH (por ejemplo, título vírico), y cantidad del tiempo desde que se contrajo el virus. Un experto en la materia, específicamente un médico, será capaz de determinar el número de células hematopoyéticas transducidas que constituirían una dosis eficaz sin someterse a experimentación innecesaria.

35 Sin pretender quedar ligados a la teoría, los solicitantes creen que una terapia de células madre exitosa para la enfermedad del VIH incluye la selección de células transducidas injertadas. En un aspecto de la invención, estudios cinéticos detallados en individuos infectados por VIH demuestran que el VIH-1 elimina y el cuerpo restituye aproximadamente de 10^9 a 10^{10} linfocitos T CD4+ al día. Esto representa una renovación del 0,5 % a, 5 % de la población total de linfocitos T CD4+ cada día, dando como resultado una renovación estimada de toda la población de linfocitos T CD4+ aproximadamente cada 2 semanas. Por lo tanto, incluso en individuos sanos infectados por VIH, no tratados, un recuento de linfocitos T CD4+ enmascara una muerte y renovación continua masiva de linfocitos T. Los linfocitos T se reemplazan a partir de dos fuentes de expansión de linfocitos T periféricos existentes, y la producción de nuevos linfocitos T no expuestos previamente a partir del timo, de una manera similar a la observada en la generación de nuevos linfocitos T después del trasplante de HPSC. La presente invención proporciona un método para reconstituir con HPSC modificadas génicamente que proporcionan una fuente continua de linfocitos T y monocitos/macrófagos protegidos. Es probable que estas células se seleccionen a la vista de la eliminación masiva de linfocitos T por el VIH.

45 El concepto de utilizar presiones selectivas que implican la muerte y regeneración de linfocitos T para seleccionar en favor de células transducidas genéticamente se basa en un sólido fundamento de conocimiento referente a la diferenciación hematopoyética y linfoide. El concepto también se ha ensayado con éxito en los estudios clínicos de terapia génica para SCID ligada a X y ADA-SCID, donde linfocitos T que contienen genes de HPSC trasplantadas se seleccionan de manera similar, dando como resultado una repoblación con linfocitos T modificados genéticamente.

50 Un caso de estudio reciente proporciona apoyo a que la reconstitución de un sistema inmune con células protegidas frente a la infección por VIH-1 puede dar como resultado una selección en favor de las células protegidas, una atenuación sustancial de la replicación del VIH-1 y un curso clínico favorable. Se trató a un individuo positivo a VIH-1 con AML concurrente mediante el trasplante de HPSC alogénicas seleccionadas específicamente de un donante homocigoto CCR5A32. De manera destacable, las células del donante CCR5A32 reemplazaron completamente a las células receptoras en un rápido periodo de 60 días, y el VIH-1 ha permanecido indetectable en el paciente durante más de 200 días en ausencia de terapia antirretroviral.

60 La invención se ilustrará a continuación en mayor detalle en referencia a las realizaciones específicas descritas en los siguientes ejemplos. Los ejemplos pretenden ser puramente ilustrativos de la invención y no pretenden limitar su alcance de modo alguno.

Ejemplos

65 **Ejemplo 1. Construcción de vector dual que contiene ARNhc contra CCR5 e inhibidor de la fusión C46 (vector**

dual de sh5/C46) y vectores de control con inserciones terapéuticas o sin ellas

A. Construcciones de vector plasmídico

5 Se diseñaron y generaron por ingeniería genética diversas construcciones en forma de ADN como plásmidos. Las construcciones se resumen en la Tabla 1 y se ilustran en las Figuras 1-4. Todas estas construcciones dan lugar a vectores lentivirales tras la transfección en líneas celulares empaquetadoras (véase la sección B más adelante).

Tabla 1. Descripción de construcciones plasmídicas de vector

Nombre completo del plásmido	Nombre corto de la construcción	Descripción
pFG11F-U-EGFP	Control de GFP	Vector lentiviral (LV) sencillo de control que contiene promotor de ubiquitina que dirige a EGFP
pFG12-H1-R5	sh5	LV individual que contiene promotor de H1 que dirige al ARNhc contra CCR5
pFG11F-U-C46	C46	LV individual que contiene promotor de ubiquitina que dirige a C46
pFG11F-H1-R5-U-C46	sh5/C46	LV dual que contiene promotor de H1 que dirige a un ARNhc contra CCR5 y promotor de ubiquitina que dirige a C46
pFG12-H1-R5-U-EGFP	sh5/GFP (también citado como sh/EGFP)	LV que contiene promotor de H1 que dirige a un ARNhc contra CCR5 y promotor de ubiquitina que dirige a EGFP

10 El diseño por ingeniería genética de estos vectores fue del siguiente modo.

15 El plásmido estructural del vector lentiviral pFG12 que contenía EGFP dirigido por el promotor de ubiquitina (pFG12-U-EGFP) (marcado como "pFG12" en la Figura 2) se derivó a partir de un vector lentiviral anterior FUGW (Lois et al., (2002) Science, Vol. 295: 868-872) tal como se ha descrito (Qin et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 100: 183-188). Para ayudar a futuras inserciones en la estructura del vector, la estructura de plásmido de pFG11F se produjo insertando sitios de clonación múltiples en FG12, permitiendo la producción de pFG11F-U-EGFP (marcado como "pG11F" en la Figura 2).

20 Se produjo una biblioteca aleatoria de ARN en horquilla corto (ARNhc) dirigido contra el correceptor de quimiocinas 5 humano (huCCR5) bajo el control de un promotor de H1 en un vector lentiviral mediante producción enzimática de bibliotecas de ARNi a partir de ADNc. Los fragmentos de ADN purificados se digirieron con Bpml, se hicieron romos sus extremos con fragmento Klenow, se digirieron con BamIII y se ligaron a ADN de plásmido pBShH 1-5, que contiene un promotor de ARN polimerasa III de H1 humana y una señal de terminación de 4T. La mezcla de ligamiento se introdujo en *E. coli* y se plantó durante la noche. Las colonias se combinaron y se preparó el ADN de plásmido. Las unidades de expresión de ARNhc que consisten en un promotor de H1, secuencia de ARNhc y señal de terminación de 4Ts se cortaron de los ADN de plásmido pBShH1-5 mediante digestión de XbaI y XhoI y se insertaron en sitios de XbaI/XhoI del vector pFG12-U-EGFP para producir ARNhc dirigido por promotor de H1 contra CCR5. La mejor de estas construcciones, sh1005, se seleccionó para experimentación posterior. La construcción de plásmido que contenía sh1005 y EGFP dirigido por promotor de ubiquitina se denomina pFG12-H1-R5-U-EGFP (Figura 3; An et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 104 (32): 13110-13115). Se retiró el casete de U-EGFP de pFG12-H1-R5-U-EGFP usando enzimas de restricción para producir pFG12-H1-R5 (Figura 3).

35 El gen de EGFP se retiró de pFG11F-U-EGFP (pFG11F en la Figura 4) y se reemplazó con el gen de C46 para producir pFG11F-U-C46 (Figura 4). El casete de H1-R5 se cortó de pFG12-H1-R5-U-EGFP usando una digestión de NdeI/XhoI y se insertaron en pFG11F-U-C46, que también se había digerido con NdeI/XhoI, para producir pFG11F-H1-R5-U-C46 (Figura 4).

B. Producción de vector lentiviral

40 Todas las reservas de vector lentiviral seudotipado de virus de la estomatitis vesicular (VSV)-G se produjeron mediante transfección transitoria mediada por fosfato de calcio células HEK-293 T. Las células HEK-293 T se cultivaron de manera rutinaria en DMEM (GIBCO Invitrogen) y se cambiaron a medio modificado de Dulbecco de Iscove (IMDM) para la transfección. Todos los cultivos contenían FCS al 10 % (HyClone), 100 unidades de penicilina, y 100 mg/ml de estreptomycin. Las células se cotransfectaron con cantidades adecuadas de plásmido de vector, las construcciones de empaquetamiento lentivirales de VIH-1 pRSV-Rev y pMDLg/pRRE, y el plásmido de expresión de VSV-G pCMV-VSV-G (Tabla 2). Los virus se recogieron de los sobrenadantes de cultivo en los días 2 y 3 después de la transfección y se concentraron. Las reservas de virus concentradas se titularon en células HEK-293 T basándose en la expresión de GFP. Los títulos para las construcciones de ARNhc de expresión de EGFP solo se redujeron ligeramente en comparación con el vector de EGFP parental. Los plásmidos usados para la producción se muestran a modo de diagrama en la Figura 5.

Tabla 2. Vectores para la producción de lentivirus

Plásmido	Descripción
pCMV-VSV-G	Plásmido que codifica la envuelta de VSVG
pMDLg/pRRE	Plásmido que codifica Gag-pol/RRE
pRSV-Rev	Plásmido que codifica Rev

Método 1: Producción de lentivirus mediante transfección de cloruro de calcio usando reactivos no en kit

- 5 1. Células HEK 293T sembradas a $1,5 \times 10^7$ células por matraz T175 en DMEM + FBS al 10 % y antibióticos el día antes de la transfección.
2. En el día de la transfección, el medio se cambió a 25 ml de IMDM con FBS al 10 %, antibióticos y cloroquina (100 μ l de 10 mM).
- 10 3. Mezcla maestra de ADN preparada
- a. pMDLg /pRRE 10 μ g
 - b. pRSV-Rev 2,5 μ g
 - c. pCMV-VSV-G 3,2 μ g
 - d. vector (por ejemplo, una de las construcciones de las Figuras 1-4) 10 μ g
 - e. Agua añadida para ajustar el volumen total a 980 μ l
- 15 4. Se añaden 133 μ l de CaCl_2 2M, se mezcla y se incuban sobre hielo durante 10 min.
5. 1110 μ l de HBS 2 x (1 g de HEPES, 1,6 g de NaCl, 0,72 ml de Na_2HPO_4 , 1 ml de KCl 1M) añadidos gota a gota mientras se agita el tubo a mano.
- 20 6. Se incuba sobre hielo durante 20 min.
7. Se invierte el matraz T175 de células, se añade la mezcla de ADN al medio, se mezcla el matraz 2-3 veces y se vuelve a colocar el matraz boca arriba.
8. El cultivo se incuba durante 6-8 h.
- 25 9. Se retira el medio y se reemplaza con 42 ml de IMDM + FBS al 10 % y antibiótico reciente.
10. 48 h después de la transducción, se recoge el medio y se filtra a través de filtro de 0,22 o 0,45 μ m y se reemplaza con 42 ml de IMDM + FBS al 10 % y antibiótico reciente.
11. 72 h después de la transducción, se recoge el medio y se filtra a través de filtro de 0,22 o 0,45 μ m.
12. Se agrupan ambas recogidas.
- 30 13. El medio que contiene virus (VCM) se concentra mediante ultracentrifugación en tubos SW28 o SW32.
- a. 33-38 ml de VCM se cargan en tubos con amortiguación de sacarosa.
 - b. Los tubos se centrifugan a 20.000 rpm a 4 °C durante 90 min.
 - c. Se retira el sobrenadante y se añaden 250-500 μ l de PBS o HBS para precipitar.
 - d. Se almacena el VCM durante toda la noche a 4 °C.
 - e. El VCM se mezcla mediante pipeteado, se separa en alícuotas y se almacena a -70 °C.
- 35

Método 2: Producción de lentivirus mediante transfección de cloruro de calcio usando el kit CalPhos de Clontech.

- 40 1. Se siembran células HEK 293T a $2,1 \times 10^7$ células/T225 en 30 ml de IMDM + FBS al 10 % en el día antes de la transfección.
2. En el día de la transfección, Se prepara la mezcla maestra de ADN en tubos de 15 ml:
- a. pMDLg /pRRE 13 μ g
 - b. pRSV-Rev 3,25 μ g
 - c. pCMV-VSV-G 4,16 μ g
 - d. vector (por ejemplo, una de las construcciones de las Figuras 1-4) 13 μ g
 - e. Agua añadida para ajustar el volumen total a 1500 μ l
- 45
3. Se añaden 186 μ l de CaCl_2 2 M y se mezcla.
- 50 4. Se añaden gota a gota 1500 μ l de HBS 2 x mientras se agita el tubo vorticialmente.
5. Se incuba a temperatura ambiente durante 20 min.
6. Se añaden 30 ml de IMDM + FBS al 2 % al tubo de 50 ml.
7. Se añade solución de ADN a IMDM en el tubo de 50 ml.
8. Se aspira el medio de las células recogidas el día anterior.
- 55 9. Se vierte cuidadosamente solución de ADN/IMDM en un matraz para no alterar la monocapa celular.
10. Se agita suavemente de lado a lado el matraz para cubrir a las células con mezcla.
11. El cultivo se incuba durante 4 horas.
12. Se retira el medio, se enjuagan las células con PBS y se reemplaza con 20 ml de IMDM + FBS al 2 % reciente.
13. A las 24 horas después de la transducción, se recoge el medio y se reemplaza con 30 ml de IMDM + FBS al 2 %

reciente.

14. El VCM recogido se filtra a través de un filtro de 0,22 µm y se almacena a 4 °C durante toda la noche.

15. A las 48 horas después de la transducción, se recoge el medio y se filtra a través de filtro de 0,22 µm.

16. Ambas recogidas de VCM se agrupan y separan en alícuotas para su almacenamiento a -70 °C.

5 17. En caso necesario, se concentra el VCM usando columnas Vivaspin 20 (Sartorius):

a. Vivaspin 20 MWCO 100 000 preparado mediante adición de 10 mL de etanol al 70 %.

b. Se centrifuga a 1000 g durante 10 min.

c. Se descarta el etanol restante y se añaden 15 ml de PBS.

10 d. Se centrifuga a 1000 g durante 10 min.

e. EL PBS restante se descarta y se añaden 18 ml de VCM.

f. Se centrifuga a 1000 g durante 30 min o hasta que todo el VCM ha pasado a través de la columna.

15 El VCM obtenido mediante alguno de los métodos se usó (diluido o concentrado) para transducir células diana (Líneas de células T, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células madre progenitoras hematopoyéticas CD34+ (HPSC)) y las células transducidas se analizaron mediante citometría de flujo respecto de la expresión de EGFP, la expresión de CCR5 (mediante tinción de anticuerpo CD195) y la expresión de C46 (mediante tinción de anticuerpo 2F5).

20 **Ejemplo 2. Transducción de líneas de células T diana humanas mediante vector dual sh5/C46**

Los diversos vectores lentivirales descritos en el Ejemplo 1 se usaron para infectar células CEM.NKR.CCR5 y Molt4/CCR5 (NIH AIDS Reagent Program). Se resuspendieron 2×10^5 en 1 ml de medio que contenía virus (VCM) no concentrado con FBS al 10 % y 8 mg/ml de polibreno. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 1,5 horas y se añadió 1 ml adicional de medio de crecimiento (RPMI + FBS al 10 %). Las células se analizaron mediante análisis FACS a los 4 días después de la transducción para la expresión de C46 (mediante tinción de anticuerpo de 2F5), *knockdown* de CCR5 (mediante tinción de anticuerpo CD195), y expresión de GFP. Las células se mantuvieron en cultivo continuo durante hasta 8 semanas pasándolas dos veces a la semana.

30 La expresión simultánea de ARNhc (detectado mediante *knockdown* de CCR5) y C46 en células CEM.NKR.CCR5 y Molt4/CCR5 transducidas se muestra en la Figura 6 y en la Figura 7, respectivamente. Se observó expresión de GFP para las construcciones que contenían EGFP (paneles 1, 3 de izquierda a derecha); se observó una reducción en la expresión de CCR5 (por ejemplo, modulación negativa de CCR5 que muestra expresión de ARNhc) para las construcciones que contenían sh5 (paneles 2, 3, 5, de izquierda a derecha), y se observó expresión de C46 (medida mediante anticuerpo de 2F5) para las construcciones que contenían C46 (paneles 4, 5, de izquierda a derecha). El porcentaje de células positivas se muestra en cada cuadrante de citometría de flujo (Q1-Q4) para cada grupo de células transducidas con los vectores lentivirales indicados a las 4 y 8 semanas en cultivo. Se observaron niveles de expresión similares en las semanas 4 y 8. Los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) para la Figura 6 se muestran en la Tabla 3 a continuación, mientras que los valores de MFI para la Figura 7 se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 3. Valores de intensidad media de fluorescencia para células CEM.NKR.CCR5 que expresan varias construcciones

	Control de GFP	sh5	Sh5/EGFP	C46	Sh5/C46
4 semanas	70,2	33,8	10,5	78,2	11,5
8 semanas	153,6	64,6	18,6	129,1	22,6

45 **Tabla 4. Valores de intensidad media de fluorescencia para células Molt4/CCR5 que expresan varias construcciones**

	Control de GFP	sh5	Sh5/EGFP	C46	Sh5/C46
4 semanas	34,4	7,3	5,0	24,1	5,9
8 semanas	80,9	25,3	18,2	69,5	51,5

50 Para determinar si los transgenes causaron alguna diferencia en los parámetros de crecimiento de las células, las células CEM.NKR.CCR5, que mostraron cada una un 100 % de expresión de la construcción transgénica, se sembraron a 2×10^4 células/ml, cultivadas durante 4 días y se contaron. Las células se sembraron a partir de esta población en cuatro ocasiones separadas durante un periodo de 3 semanas a 1 o 2×10^5 /ml y se contaron 4-7 días después. No se observaron diferencias en las velocidades de crecimiento de las células transducidas con las diferentes construcciones (Figura 8).

55 Los resultados de estos experimentos demuestran que tanto el ARNhc que se dirige a CCR5 como la proteína C46

pueden expresarse de manera suficiente a partir del mismo vector en líneas de células T humanas, y la expresión de ARNhc de CCR5 y de C46 no tiene efecto en la velocidad de crecimiento de las células.

Ejemplo 3. Transducción de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) mediante vector dual de sh45/C46

Los diversos vectores descritos en el Ejemplo 1 se usaron para infectar células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC) obtenidas del Servicio de Transfusión de Sangre de la Cruz Roja Australiana. Se aislaron los PBMC a partir de capas leucocitarias usando Ficoll-plaque PLUS (GE Healthcare) seguido de eliminación de CD8 usando microperlas de CD8+ (Miltenyi Biotec) y una unidad magnética VarioMACS. Los PBMC desprovistos de CD8+ se cultivaron durante 48 horas en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 20 % y 5 mg/ml de fitohemaglutinina (PHA) (Sigma) a 2×10^6 células/ml. Después de 2 días de estimulación con PHA, se recogieron las células en suspensión, se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos y se resuspendieron a 2×10^6 células/ml de RPMI + FBS al 20 % + 10 U/ml de interleucina 2 humana recombinante (rhIL-2, Roche) durante 5 horas antes de la transducción.

Para determinar el método de transcripción preferido, se transdujeron los PBMC con la construcción lentiviral sh5/EGFP usando diversas condiciones: transducción 1x con VCM, transducción 2x con VCM, transducción 1x con precarga de VCM (Precarga 1), transducción 2x con precarga de VCM (Precarga 2), VCM concentrado aproximadamente 20 veces (concentrado) (véase el Ejemplo 1, sección B). Tal como se muestra en la Figura 9, la transducción fue más eficiente con virus concentrado. Se seleccionó una sola transducción con precarga de VCM (Precarga 1) como el método preferido para experimentos posteriores. Los valores de MFI para la Figura 9 se muestran en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5. Valores de intensidad media de fluorescencia para PBMC que expresan construcción de sh5/EGFP

	Transd. 1x	Transd. 2x	Transd. 1x precarga de VCM	Transd. 2x precarga de VCM	VCM cone
Replicado 1	25,9	20,0	22,5	16,0	16,8
Replicado 2	28,4	24,3	20,1	16,7	15,6

Los PBMC se dejaron bien sin transducir o se transdujeron (precarga 1X) con uno de sh5/GFP, C46, sh5/C46, control de GFP o construcciones lentivirales de sh5 de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se transfirió 1 ml de PBMC en placas de 24 pocillos recubiertas con retronectina (5 mg/cm^2) precargadas previamente (6 horas) con 250 µl de VCM no concentrado y se cultivaron durante toda la noche. Al día siguiente, las células se transfirieron a placas de 6 pocillos en 3 ml de RPMI + FBS al 20 % + 10 U/ml de rhIL-2. Las células se analizaron respecto a expresión de EGFP, CCR5 y C46 4 días después la transducción. Los resultados se muestran en las Figuras 10-13.

Tal como se muestra en la Figura 10, la expresión de EGFP, CCR5, y C46 en PBMC en el día 4 después de la transducción fue como se esperaba para las diferentes construcciones. Se observó expresión de EGFP para las construcciones que contenían EGFP (control de GFP y sh5/GFP; paneles 1, 2), se observó una reducción en la expresión de CCR5 (que ilustra la expresión de ARNhc de CCR5) para las construcciones que contenían sh5 (sh5/EGFP y sh5/C46, paneles 2 y 4), y se observó expresión de C46 (medida mediante anticuerpo de 2F5) para las construcciones que contenían C46 (C46 y sh5/C46; paneles 3, 4). Los valores de MFI; de izquierda a derecha en la Figura 10, fueron 16,2, 8,4, 16,8, 9,4.

La Figura 11 muestra una comparación de la expresión génica en PBMC transducidas (en el día 4) y la línea celular transducida CEM.NKR.CCR5 T (en la semana 8). Se observó expresión de EGFP en células transducidas con las construcciones que contenían EGFP (control de GFP y sh5/GFP; paneles 1 y 2); se observó regulación negativa de CCR5 en células transducidas con las construcciones que contenían sh5 (sh5/EGFP y sh5/C46; paneles 2 y 4), y se observó expresión de C46 (medida mediante anticuerpo de 2F5) en células transducidas con las construcciones que contenían C46 (C46 y sh5/C46; paneles 3 y 4). Aunque se observaron niveles suficientes de expresión a partir de las construcciones lentivirales en ambos tipos celulares, se observaron niveles de expresión mayores en las células T en comparación con PBMC. Los valores de MFI para la Figura 11 se muestran en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6. Valores de intensidad media de fluorescencia para PBMC o células T CEM.NKR.CCR5 que expresan varias construcciones

	Control de GFP	Sh5/EGFP	C46	Sh5/C46
PBMC	16,2	8,4	16,8	9,4
Línea de células T	153,6	18,6	129,1	22,6

Además, las velocidades de crecimiento se compararon entre PBMC transducidos con gen (sh5, sh5/EGFP, C46 y sh5/C46) y no transducidos en los días 1, 4, 8 y 12. Se usaron dos siembras duplicadas de cada grupo. Las células totales/pocillo y el porcentaje de células viables fueron similares para todos los PBMC transducidos cuando se

compararon entre sí y con las células no transducidas (Figura 12).

También se ensayó la estabilidad de la expresión del transgén en PBMC. La Figura 13 muestra expresión de EGFP, CCR5, y C46 (medida mediante anticuerpo de 2F5) en células transducidas con las construcciones indicadas en los días 4, 7 y 12. La viabilidad de las células en el día 12 no fue determinante y por lo tanto se efectuaron comparaciones solo entre los días 4 y 7. Tal como se muestra en la Figura 13, los diversos transgenes se expresaron en ambos instantes con una disminución evidente a lo largo del tiempo, lo que está probablemente relacionado con la disminución del crecimiento y la viabilidad a lo largo del tiempo (véase la Figura 12). Los valores de MFI para la Figura 13 se muestran en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7. Valores de intensidad media de fluorescencia para PBMC que expresan varias construcciones

	Control de GFP	sh5	Sh5/EGFP	C46	Sh5/C46
Día 4	16,2	10,8	8,4	16,8	9,4
Día 7	13,2	12,6	8,7	14,4	10,8

Estos resultados demuestran que tanto el ARNhc que se dirige a CCR5 como la proteína C46 pueden expresarse de manera suficiente a partir del mismo vector en PBMC humanos.

Ejemplo 4. Transducción de células madre/hematopoyéticas humanas (HPSC) mediante vector dual sh5/C46

El vector lentiviral sh5/C46 (LV) se usó para transducir células madre/progenitoras hematopoyéticas CD34+ (HPSC) obtenidas de células mononucleares de sangre periférica de donante en bruto. Se inyectó a los donantes con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) para movilizar las HPSC y las células mononucleares de sangre periférica. Después de la inyección de G-CSF, las células se recogieron mediante aféresis y se congeló la población de células mononucleares que contenía HPSC movilizadas. La muestra de células mononucleares usada en este ejemplo se obtuvo a partir de estas reservas concentradas. Una bolsa de recogida de células madre de 50 ml en la que se estimó que contenía en el momento de la congelación $3,7 \times 10^7$ HPSC CD34+, se descongeló. Durante la descongelación, se descubrió que contenía un total de $33,6 \times 10^8$ células viables (viabilidad del 73 %) y el número resultante de HPSC CD34+ aislado usando MACS (separación de células con anticuerpo magnético) se encontró dentro de las expectativas a $\sim 3,3 \times 10^7$, es decir, ~ 1 % del número total de células mononucleares, con un 98 % positivo a CD34 (véanse los análisis pre y post-separación en el panel superior de la Figura 14).

Estas células se usaron entonces en el siguiente protocolo experimental:

1. Se pre-estimularon 6×10^6 durante 24 en medio sin suero X-vivo que contenía factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO) y ligando Flt3 (Flt3L) (cada uno a 50 ng/ml).
2. Entonces se transfirieron alícuotas de 4×10^5 células a una placa de 12 pocillos precargada durante 6 horas con medio que contiene virus (VCM). Las células se transdujeron durante toda la noche (con control de GFP, sh5, sh5/EGFP, C46, o sh5/C46), o se dejaron sin transducir, y después se transfirieron a medio reciente durante 72 horas.
3. El análisis FACS efectuado a las 72 horas después de la transducción demostró una transducción del 25-30 % mediante GFP (Figura 14, panel inferior). En este ejemplo, C46 no fue detectable mediante tinción de 2F5, aparentemente debido a la carencia de sensibilidad de la citometría de flujo con estas células. Las células restantes se pusieron en cultivos de metilcelulosa CAMEO-4 (Hemogenix), se emplacaron a 100 células/pocillo en duplicado. Cuando se marcaron para colonias, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos en el día 11 (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentajes de colonias de HPSC CD34+ transducidas con diversas construcciones lentivirales

	CFU-E	BFU-E	CFU-GM
Control (no transducido)	30,5	9,9	59,6
Control de GFP	15,6	28,9	55,6
Control de GFP	18,5	9,3	72,2
sh5	41,2	11,8	47,1
sh5/EGFP	26,0	30,0	44,0
sh5/EGFP	10,4	4,5	85,1
C46	10,2	28,6	61,2
C46	21,4	17,9	60,7

sh5-C46	17,6	35,3	47,1
sh5/C46	15,4	38,5	46,2
Promedio	20,7	21,5	57,9
Desv. Est.	9,6	12,2	13,1

Ejemplo 5. Las líneas de células T transducidas con vector dual sh5/C46 inhiben la replicación del VIH

Se expusieron líneas de células T (Molt4/CCR5) con la construcción lentiviral dual sh5/C46 (véase la descripción del vector en el Ejemplo 1) con varias cepas de VIH: VIH_{Bal} (CCR5 trópica), VIH_{III_B} (CXCR4 trópica), y VIH_{SF2} (CCR5 y CXCR4 trópica). Para los ensayos de exposición, se añadieron 1×10^6 células Molt4/CCR5 transducidas a tubos de 15 ml y se centrifugaron. Se descartó el sobrenadante. El medio que contenía virus del VIH (VCM) se añadió a una concentración final por tubo a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,2-0,002. Entonces se añadió polibreno a una concentración final de 8 µg/ml y se golpeó levemente cada tubo. Las células y virus se incubaron durante 2 horas a 37 °C con agitación suave cada 30 minutos. Después de la incubación de 2 horas, las células se lavaron en medio (RPMI + FBS al 10 %) y se resuspendieron en 3-4 ml de medio en matraces T25. Las células se muestrearon y alimentaron cada 3-4 días hasta el día 11. Se retiraron 150 µl de sobrenadante por duplicado y se almacenaron a 4 °C. Se ensayaron los niveles de proteína P24 (una medida de la infección por VIH) según el protocolo del fabricante usando generalmente una dilución 1/10⁵ a 1/10⁶ para asegurarse de que los valores se encontraban en la curva patrón.

La Figura 15 muestra los niveles de proteína de células no transducidas o células transducidas con la construcción lentiviral dual sh5/C46 13 días después de la exposición con cepa SF2 de VIH trópica dual (CCR5 y CXCR4 trópica). Los resultados demuestran que las células transducidas con la construcción sh5/C46 mostraron una inhibición de aproximadamente 2 log en todas las tres MOI (0,2, 0,02, 0,002) en cada uno de los 2 muestreos independientes, en comparación con células no transducidas. La Figura 16 muestra los niveles de proteína p24 de células no transducidas o células transducidas bien con la construcción lentiviral sh5/C46 o C46 11 días después de la exposición a cepa SF2 de VIH trópica. Los datos muestran aproximadamente una inhibición 2 log mediante la construcción sh5/C46 en cada uno de los dos muestreos independientes y una inhibición 3 log mediante C46 (aparentemente debido a una mayor expresión de C46 en esta construcción particular) a los dos MOI ensayados. El panel inferior de la Figura 16 muestra la expresión mediante citometría de flujo. Los valores de intensidad de fluorescencia media se muestran en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9. Valores de intensidad media de fluorescencia para células Molt4/CCR5 que expresan construcciones lentivirales C46 o sh5/C46

	No transducidas	C46	Sh5/C46
CCR5 MFI	1478,8	1811,0	144,9
2F5 MFI	344,6	1454,4	1171,8

En un experimento separado, las células Molt4/CCR5 bien no se transdujeron o se transdujeron con construcciones lentivirales de C46 (Gen 2) o sh5/C46 (G2R5) y posteriormente se expusieron a virus VIH-SF2 trópico dual (CCR5 y CXCR4), Bal (CCR5 trópica) o NL4-3 (CXCR4 trópica) a un MOI de 0,2. Los niveles de proteína P24 se evaluaron 11 días después de la exposición viral como medida de la infección por VIH. Tal como se muestra en la Figura 17, las células que expresaban ambas construcciones lentivirales fueron eficaces para reducir la infección con todas las tres cepas de VIH. La Figura 18 muestra los niveles de proteína p24 a partir de células no transducidas (Molt4) o células transducidas con una de cuatro construcciones lentivirales [(1) sh5 (R5); (2) C46 (G2); (3) sh5/C46 (R5-G2); (4) sh5/EGFP (R5-GFP)] 7 y 10 días después de la exposición a la cepa trópica Bal de VIH CCR5 a un MOI de 0,2. El grupo "mixto" es una mezcla de no transducidas, sh5, C46, sh5/C46 todas mezcladas por igual (es decir, un 25 % de cada). Los resultados demuestran que las células que expresan el ARNhc contra CCR5 y el gen C46 a partir de una sola construcción lentiviral (construcción dual) proporcionan protección potenciada contra la infección con una cepa trópica de VIH CCR5 tanto a los 7 como a los 10 días después de la exposición viral.

Los resultados de esta serie de experimentos demuestran que las células T transducidas con la construcción lentiviral dual sh5/C46 proporcionan protección contra la infección con cepas trópicas CCR5, CXCR4, y trópicas duales CCR5 y CXCR4 de VIH.

Ejemplo 6. Los PBMC transducidos con vector dual sh5/C46 inhiben la replicación del VIH

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas con fitohemaglutinina (PHA)/IL2 se transdujeron con vectores lentivirales, tal como se describe en el Ejemplo 3. En la Figura 19A se muestra un esquema de la construcción dual que expresa ARNhc contra CCR5 y proteína C46 (LVsh5C46). Cuatro días después de la transducción, se tiñeron las células con el anticuerpo monoclonal adecuado (por ejemplo, anticuerpo de CD195 o 2F5) y CCR5, C46, y se analizó la expresión de GFP mediante citometría de flujo (Figura 19B). Los PBMC transducidos de

manera lentiviral (LV) se expusieron con cepas trópicas R5 o X4 de VIH 16 días después de la transducción con LV. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron cuatro días después de la infección por VIH y se ensayaron respecto de la proteína p24 mediante ELISA (Figura 19C).

- 5 Tal como se muestra en la Figura 19C, los PBMC transducidos con vector lentiviral sh5/C46 muestran infección por VIH inducida mediante cepas trópicas tanto R5 como X4, según se evalúa mediante niveles de proteína p24. Los PBMC transducidos con una construcción sh5/C46 son resistentes a la infección inducida por VIH trópico R5 pero no X4. Estos resultados indican que el vector dual sh5/C46 es capaz de proteger contra la infección por VIH inducida por cepas trópicas de R5 o X4.

10 **Ejemplo 7. El vector sh5 regula negativamente la expresión de CCR5 en órganos linfoides y efectúa supervivencia preferencial de linfocitos T CD4+ transducidos *ex vivo***

15 Se implantaron células madre/hematopoyéticas CD34+ (HPSC) solidificadas con Matrigel en combinación con un segmento de timo bajo la cápsula renal de un modelo de ratón de médula ósea/hígado/timo (BLT) humanizado (véase Melkus et al. (2006) Nat Med. Vol. 12:1316-1322; Shimizu et al. (2010) Blood, Vol. 115:1534-1544). El ratón humanizado NOD/SCID-hu BLT permite examinar la diferenciación de HPSC humanas transducidas en el organoide similar al timo (thy/liv), y la migración de linfocitos T diferenciados en órganos linfoides sistémicos, incluyendo tejido linfoide asociado a los intestinos, el sitio principal de replicación del VIH.

20 Para examinar a sh1005 (ARNhc que se dirige a CCR5) en este modelo humanizado de ratón, las células CD34+ derivadas con hígado fetal transducidas con vector y las células CD34- solidificadas con matrigel y un segmento de timo se trasplantaron en la cápsula renal para generar un tejido de thy/liv transducido con vector. Tres semanas después, los HPSC CD34+ autólogos transducidos con vector (1×10^6 células) se inyectaron a través de la vena caudal del ratón irradiado subletalmente. Para evaluar el impacto de la reducción de CCR5 en un animal, se trasplantó una mezcla a partes iguales de HPSC CD34+ transducidas con vector sh1005 (EGFP+), y vector de control no ARNhc (mCherry+) (5×10^5 células). Este diseño experimental permite examinar si las células transducidas con vector sh1005 difieren de células transducidas con vector no de ARNhc respecto al nivel de estabilidad y especificidad de la reducción de CCR5; ambos vectores están presentes en el mismo animal para controlar a variación de ratón a ratón. Ni EGFP ni mCherry solo tuvo cualquier efecto en la cinética de repoblación o en la expresión de CCR5 (datos no mostrados).

35 El injerto de células humanas se examinó a partir de 11 semanas después de la inyección de CD34+. Se detectaron células linfoides CD45+ en una población de linfocitos clasificada de sangre periférica de ratones trasplantados mediante análisis de citometría de flujo (promedio 44 %, DE \pm 28, n=19). Se encontró expresión de EGFP y de mCherry en esta población de CD45+ humanos en ratones trasplantados (promedio de EGFP 22 %, DE \pm 19, promedio de mCherry 22 %, DE \pm 13, n=16). Se examinó el *knockdown* de CCR5 en linfocitos T CD4+ y CD45+ humanos en varios tejidos linfoides en animales reconstituidos a las 14-20 semanas después del trasplante de HPSC CD34+ (Figura 20A). La expresión de CCR5 se redujo de manera eficaz en linfocitos T humanos EGFP+ CD4+ y CD45+ en todos los tejidos analizados. De manera notable, la reducción de CCR5 fue eficaz incluso en los linfocitos de la lámina propia que expresan CCR5 de manera elevada aislados del intestino. CCR5 no se redujo en linfocitos T humanos mCherry+ CD4+/CD45+ en el mismo animal. Estos resultados indican que la expresión de ARNhc de CCR5 no afectó a la diferenciación y migración de linfocitos T humanos e indujo de manera eficaz la regulación negativa de CCR5 en órganos linfoides sistémicos *in vivo*.

45 Para examinar la susceptibilidad al VIH en células reguladas negativamente para CCR5, se aislaron esplenocitos EGFP+ y mCherry+ del animal mediante clasificación celular. Las células clasificadas se infectaron con VIH-1_{NFNSXSL9} trópico de R5 o VIH-1_{NL4-3} trópico de X4 a una multiplicidad de infección de 2,5 por triplicado. No hubo aumento en la producción de proteína de la cápsida gag de VIH p24 en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos EGFP+ durante el periodo de cultivo de 12 días (Figura 20B). Por el contrario, los esplenocitos mCherry+ fueron susceptibles a VIH-1_{NFNSXSL9} trópico de R5, y produjeron niveles aproximadamente 4 veces mayores de p24 en el sobrenadante de cultivo en los días 7 y 12 (valor de P = 0,003), lo que indica que la regulación negativa de CCR5 inhibió de manera eficaz la infección por VIH-1 trópico de R5. A diferencia de la infección por VIH-1 trópico de R5, la infección por VIH-1_{NL4-3} trópico de X4 produjo cantidades comparables de p24 en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos EGFP+ y mCherry+ confirmando la especificidad de la inhibición (valor de P = 0,23). Estos resultados demostraron que la regulación negativa de CCR5 mediante sh1005 fue suficiente para proteger a células estimuladas *ex vivo* a partir de exposición a VIH-1 trópico de R5 pero no de X4.

60 Para examinar la susceptibilidad al VIH *in vivo* y la protección selectiva y supervivencia de linfocitos T CD4+ regulados negativamente para CCR5, se inyectó VIH-1_{NFNSXSL9} trópico de R5 por vía intravenosa (p24 = 200 ng) en ratones reconstituidos a las 9 semanas después del trasplante de HPSC. Se confirmó que los ratones estaban infectados por VIH mediante la presencia de p24 en sobrenadante de sangre periférica de ratón cultivada conjuntamente con PBMC humanos activados con PHA/IL2 a las 8 semanas después de la inyección de VIH. Se examinaron las cinéticas en sangre periférica de linfocitos T CD4+ que expresaban EGFP y mCherry (Figura 20C). El porcentaje de población EGFP+ en linfocitos T CD4+ en sangre periférica aumentó del 20 % al 40 % a las 8 semanas después de la inyección de VIH en los animales. Por el contrario, la población mCherry+ en linfocitos T CD4+ disminuyó de un 40 % a un 3 % en los animales. Se examinó la inversión de la relación CD4/CD8 indicadora de la pérdida de linfocitos T CD4 inducida por

VIH. La relación CD4/CD8 en linfocitos EGFP+ se mantuvo por encima de 1 a las 8 semanas después de la exposición a VIH en sangre periférica (Figura 20D). Por el contrario, La relación CD4/CD8 en células mCherry+ CD45+ se invirtió a 0,1. Estos resultados demuestran que la regulación negativa estable de CCR5 mediante sh1005 fue suficiente para aumentar preferentemente los linfocitos T CD4+ después de la exposición a VIH trópico de R5 *in vivo*.

5

Ejemplo 8. Ensayo del vector dual sh5/C46 en el modelo de ratón humanizado

Tal como se describe en el Ejemplo 7 para el vector sh5 (Shimizu et al., (2010) Blood, Vol. 115: 1534-1544), el vector lentiviral de sh5/C46 se ensaya en el modelo de ratón BLT humanizado. Para examinar el vector dual sh5/C46 en este modelo de ratón humanizado, las células CD34+ y las células CD34- derivadas de hígado fetal transducidas con vector se solidificaron con matrigel y un segmento de timo y se trasplantan debajo de la cápsula renal para generar un tejido thy/liv transducido con vector. Tres semanas después, los HPSC CD34+ autólogos transducidos con vector (1×10^6 células) se inyectaron a través de la vena caudal del ratón irradiado subletalmente. Para evaluar el impacto de la reducción de CCR5 y la expresión de C46 en un animal, se trasplanta conjuntamente una mezcla de HPSC CD34+ transducidos con vector dual sh5/C46 (EGFP+)- y vector de control (lentiviral vacío) (mCherry+) (5×10^5 células). Otros controles, tales como el vector individual sh5 que contiene otra proteína fluorescente (por ejemplo, YFP) y un vector individual de C46 que contiene otra proteína fluorescente (por ejemplo, CFP) se usan para transducir HPSC CD34+ y están presentes en la mezcla para trasplante. Este diseño experimental permite examinar la diferencia entre células transducidas con diversas construcciones con respecto al nivel de estabilidad y especificidad de la reducción de CCR5 y la expresión de C46; todos los vectores están presentes en el mismo animal para controlar a variación de ratón a ratón.

25

Las células de control (mCherry+) y sh5/C46 activas (EGFP+) transducidas se comparan a lo largo del tiempo usando citometría de flujo y RT-PCR. Las comparaciones se efectúan entre células sh5/C46 transducidas y células transducidas con uno de los vectores individuales (sh5 o C46). La susceptibilidad a la infección por VIH se examina inyectando una cepa de VIH trópica de R5, X4, o dual por vía intravenosa en animales reconstituidos después del trasplante de HPSC. El porcentaje de linfocitos T CD4+ y las relaciones de linfocitos T CD4/CD8 en cada una de las poblaciones transducidas con vector se evalúa para determinar la efectividad del silenciamiento de CCR5 y la expresión de C46 en la supervivencia de linfocitos T CD4+.

30

Ejemplo 9. Uso de construcciones duales en pacientes con VIH humanos

Una construcción lentivírica dual, que incluye el vector dual sh5/C46, el vector dual sh5/TRIM5 α o el el vector dual sh5/TRIM5 α -ciclofilina se introduce en células humanas autólogas y posteriormente se administran al paciente. La construcción lentivírica dual se introduce en una o más células HPSC CD34+, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, monocitos/macrófagos aislados del paciente al que se reimplantarán (por ejemplo, células autólogas). Como alternativa, se usan células de otro individuo (alógenas). Como alternativa, se usa un vector triple, tal como se ha descrito en el presente documento.

40

Con respecto al tropismo de VIH, muchos pacientes tendrán un virus de R5, una proporción menor tendrá virus de X4, y un número intermedio tendrá una población mixta. Las construcciones duales descritas en el presente documento tienen la capacidad de dirigirse a virus tanto de R5 como de X4 y pueden ser beneficiosas para pacientes con una población celular mixta y también pueden prevenir la resistencia en aquellos con una sola población. Las construcciones también pueden ser beneficiosas en pacientes con virus resistente a HAART.

45

Las células para su transducción se obtienen del paciente inyectando una o más citocinas que movilizan a HPSC y a otras células, y las poblaciones celulares relevantes se separan para transducción lentiviral. Las células transducidas se introducen por vía intravenosa en el mismo paciente o en otro paciente para tratar o prevenir la infección por VIH. Se usan una o más dosis o infusiones de las células, tal como se describen en el presente documento.

50

El ensayo clínico se diseña basándose en consideraciones que incluyen el estado clínico del paciente, el tratamiento previo y/o la resistencia al tratamiento. Se incluyen en el ensayo diferentes grupos de pacientes. Por ejemplo, un subconjunto de pacientes no ha recibido aún terapia antirretroviral altamente activa (es decir, no han estado expuestos previamente a HAART). En general, estos pacientes están bastante sanos (independientemente de su historial de infección por VIH) y los criterios de selección para recibir células hematopoyéticas transducidas con vector lentiviral dual pueden incluir aquellos pacientes que tienen un historial de disminución de CD4 relativamente rápido, elevada carga viral, y/o síntomas tempranos. La Figura 21 muestra una respuesta esperada en dicho grupo de pacientes. Las células transducidas con vector lentiviral dual se introducen en un paciente en un momento 0. Las Figuras 21A y 21B muestran predicciones de carga viral y recuento de CD4 en pacientes tratados con una infusión de células transducidas (estrella) frente a pacientes que no reciben células transducidas con vector lentiviral dual (triángulo). Se espera que los pacientes no tratados mantengan una elevada carga viral y una disminución continuada en el recuento de CD4 a lo largo del tiempo. Por el contrario, aquellos tratados con las células transducidas con el vector lentiviral dual se espera que muestren una disminución en la carga viral a lo largo del tiempo y un aumento en el recuento de CD4 (después de una potencial disminución inicial debido a la aféresis). Por lo tanto, el tratamiento puede retrasar la necesidad de HAART y/o reducir su necesidad una vez que se ha iniciado la HAART.

65

Un segundo subconjunto de pacientes es positivo a VIH y actualmente bien controlado en HAART. La Figura 22 detalla una respuesta esperada a una sola infusión de células transducidas con vector lentiviral dual en dicho grupo de pacientes. Se muestra la carga viral predicha para un paciente tratado con una dosis de células transducidas (estrella) frente a un paciente no tratado (triángulo). Las células transducidas con vector lentiviral dual se introducen en un paciente en un momento 0. Se efectúan dos interrupciones del tratamiento HAART en varios instantes (ATI), por ejemplo, en las semanas 24-28 y 40-48, continuando los pacientes sin HAART si la carga viral permanece por debajo de un límite de seguridad establecido previamente (por ejemplo, 100K copias/ml). Las interrupciones de HAART son para proporcionar un periodo en el que puede haber supervivencia preferencial inducida por VIH de aquellas células protegidas por la construcción lentiviral dual y una disminución resultante en la carga viral. El punto final principal es a la semana 48, pero también se puede medir el área bajo la curva de la carga viral entre las semanas 40-48 y 40-100. La carga viral predicha disminuye a largo plazo para pacientes tratados y no tratados (aunque más lentamente para pacientes que no reciben infusiones de células transducidas con vector lentiviral dual) a medida que los pacientes retoman la HAART (según sea necesario). El tratamiento puede reducir la necesidad de HAART y sus complicaciones asociadas.

Un tercer grupo de pacientes comprende individuos que está fracasando con la HAART debido a resistencia a los fármacos de la HAART, al no cumplimiento, o a alguna otra razón. La Figura 23 ilustra la carga viral predicha (Figura 23A) y el recuento de CD4 predicho (Figura 23B) esperados en dicho paciente. Después de la infusión de células transducidas con vector lentiviral dual en el día 0, se espera que la carga viral disminuya y el recuento de CD4 aumente (estrella) en comparación con un paciente no tratado, donde se espera que la carga viral permanezca igual o aumente y se espera que el recuento de CD4 disminuya a lo largo del tiempo (triángulo).

Los puntos finales en todos los grupos de pacientes incluyen carga viral, recuentos de CD4, tiempo para retomar/iniciar la HAART, porcentaje de células transducidas, y círculos de escisión de receptor de linfocitos T (medida de emigrantes tímicos recientes) y necesidad reducida de HAART.

Ejemplo 10. Construcción de vector dual que contiene ARNhc contra CCR5 y TRIM5α (vector dual sh5/TRIM5α)

Se construye un vector lentiviral que contiene un ARNhc que se dirige a CCR5 bajo el control de un promotor H1 y un ácido nucleico que codifica una proteína TRIM5α bajo el control de un promotor de ubiquitina usando los vectores estructurales descritos en el Ejemplo 1. Por ejemplo, se elimina el casete U-EGFP de pFG12-H1-R5-U-EGFP, la construcción de plásmido que contiene sh1005 y EGFP dirigido por el promotor de ubiquitina (véase la Figura 3), usando enzimas de restricción para producir pFG12-H1-R5.

Se elimina el gen de EGFP de pFG11F-U-EGFP (pFG11F en la Figura 4) y se reemplaza con el gen de TRIM5α (SEQ ID NO: 5) para producir pFG11F-U-TRIM5α. Se corta el casete H1-R5 de pFG12-H1-R5-U-EGFP usando una digestión de NdeI/XhoI y se inserta en pFG11F-U-TRIM5α, que también se ha digerido con NdeI/XhoI, para producir pFG11F-H1-R5-U-TRIM5α (Figura 24A). Esta construcción se emplea para producir lentivirus tal como se describe en la Sección B del Ejemplo 1.

Ejemplo 11. Construcción de vector triple que contiene ARNhp contra CCR5, C46, y TRIM5α (vector triple de sh5/C46/TRIM5α)

Se produce un vector triple a partir del vector dual pFG11F-H1-R5-U-C46 clonando el promotor de β-actina TRIM5α en un sitio de clonación múltiple tal como se muestra en la Figura 24B. Los siguientes párrafos numerados contienen declaraciones de combinaciones amplias de los elementos técnicos desvelados en el presente documento.

[Párrafo 1] Un vector de expresión que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de un correceptor de VIH y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que inhibe la fusión de VIH con una célula diana o replicación de VIH.

[Párrafo 2] El vector de expresión del párrafo 1, en el que el vector de expresión es un vector vírico.

[Párrafo 3] El vector de expresión del párrafo 2, en el que el vector vírico es un vector lentivírico o un vector retrovírico.

[Párrafo 4] El vector de expresión del párrafo 3, en el que el vector lentivírico es autoinactivante.

[Párrafo 5] El vector de expresión del párrafo 1, en el que el vector de expresión confiere resistencia a infección por cepas de VIH X4 y R5 trópicas cuando se expresa en una célula hospedadora.

[Párrafo 6] El vector de expresión del párrafo 1, en el que el vector de expresión confiere resistencia a infección por cepas de VIH resistentes a terapia antirretrovírica altamente activa (HAART) cuando se expresa en una célula hospedadora.

- [Párrafo 7] El vector de expresión del párrafo 1, que comprende además una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de unión vírica de VIH, fusión vírica de VIH con la membrana celular diana o replicación vírica de VIH.
- 5 [Párrafo 8] El vector de expresión del párrafo 1, en el que el inhibidor de un correceptor de VIH es un ARNip o ARNhp que tiene una región bicatenaria, en el que la región bicatenaria comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica y complementaria a una secuencia de dicho correceptor de VIH.
- 10 [Párrafo 9] El vector de expresión del párrafo 8, en el que el dicho correceptor de VIH es CCR5 o CXCR4.
- [Párrafo 10] El vector de expresión del párrafo 9, en el que el ARNhp tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1.
- 15 [Párrafo 11] El vector de expresión del párrafo 1, en el que el inhibidor es capaz de reducir la expresión del correceptor de VIH cuando dicho vector se expresa en una célula hospedadora.
- [Párrafo 12] El vector de expresión del párrafo 1, en el que la proteína que inhibe la fusión de VIH con una célula diana es una proteína C46, una proteína T20, enfuvirtida, CP₃₂M y sifuvirtida.
- 20 [Párrafo 13] El vector de expresión del párrafo 1, en el que la proteína que inhibe la replicación de VIH se selecciona del grupo que consiste en TRIM5 α humana, TRIM5 α de rhesus, TRIM5 α quimérica, una proteína de fusión de TRIM5-ciclofilina humana, ciclofilina, ubiquitina E3, APOBEC3G y antígeno 2 de célula del estroma de la médula ósea (BST-2).
- 25 [Párrafo 14] El vector de expresión del párrafo 13, en el que la TRIM5 α quimérica comprende un dominio amino terminal de una proteína TRIM5 α humana y un dominio PRYSPRY carboxilo terminal de una proteína TRIM5 α de rhesus.
- [Párrafo 15] El vector de expresión del párrafo 1, en el que dichas primera y segunda secuencias de ácido nucleico están unidas operativamente a un promotor.
- 30 [Párrafo 16] El vector de expresión del párrafo 15, en el que dicho promotor es un promotor de ARN polimerasa II o ARN polimerasa III.
- [Párrafo 17] El vector de expresión del párrafo 1, en el que dicha primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con un primer promotor y dicha segunda secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con un segundo promotor.
- 35 [Párrafo 18] El vector de expresión del párrafo 17, en el que dichos primer y segundo promotores son iguales.
- 40 [Párrafo 19] El vector de expresión del párrafo 17, en el que dichos primer y segundo promotores son diferentes.
- [Párrafo 20] El vector de expresión del párrafo 19, en el que dicho primer promotor es un promotor de ARN polimerasa III y en el que dicho segundo promotor es un promotor de ARN polimerasa II.
- 45 [Párrafo 21] El vector de expresión del párrafo 7, en el que dicha tercera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con un tercer promotor.
- [Párrafo 22] El vector de expresión del párrafo 21, en el que dicho tercer promotor es el mismo que o diferente de los primer y segundo promotores.
- 50 [Párrafo 23] El vector de expresión del párrafo 16, en el que dicho promotor de ARN polimerasa III es un promotor de H1 pol III.
- [Párrafo 24] El vector de expresión del párrafo 16, en el que dicho promotor de ARN polimerasa II es un promotor de UbiquitinaC pol II.
- 55 [Párrafo 25] Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión del párrafo 1.
- [Párrafo 26] La célula hospedadora del párrafo 25, en la que la célula hospedadora es resistente a infección por cepas de VIH X4 o R5 trópicas.
- 60 [Párrafo 27] La célula hospedadora del párrafo 26, en la que la célula hospedadora es resistente a infección por cepas de VIH resistentes a HAART.
- 65 [Párrafo 28] La célula hospedadora del párrafo 25, en la que dicha célula hospedadora es una célula madre/progenitora hematopoyética, un monocito, un macrófago, una célula mononuclear de sangre periférica, un

linfocito T CD4+, un linfocito T CD8+ o una célula dendrítica.

5 [Párrafo 29] Un vector de expresión que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un ARNhp que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1 y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína C46, en el que dicha primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con un promotor de H1 pol III y dicha segunda secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con un promotor de UbiquitinaC pol II.

10 [Párrafo 30] Un vector de expresión que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer ARNhp, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo ARNhp, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de fusión vírica de VIH con una célula diana o replicación de VIH.

15 [Párrafo 31] El vector de expresión del párrafo 30, en el que dicha primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con un primer promotor, dicha segunda secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con un segundo promotor y dicha tercera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con un tercer promotor.

20 [Párrafo 32] El vector de expresión del párrafo 30, en el que dicho primer ARNhp se dirige a CCR5 y dicho segundo ARNhp se dirige a CXCR4.

25 [Párrafo 33] Un método para tratar o prevenir infección por VIH en un paciente que comprende transducir células hematopoyéticas con el vector de expresión del párrafo 1 y trasplantar dichas células hematopoyéticas transducidas en el paciente, en el que dichas células hematopoyéticas transducidas son resistentes a infección por VIH.

[Párrafo 34] El método del párrafo 33, en el que dichas células hematopoyéticas son células madre/progenitoras hematopoyéticas (HPSC), linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, monocito/macrófagos o combinaciones de los mismos.

30 [Párrafo 35] El método del párrafo 34, en el que dichas HPSC trasplantadas generan granulocitos, monocito/macrófagos y linfocitos que son resistentes a infección por VIH.

[Párrafo 36] El método del párrafo 33, en el que dichas células hematopoyéticas son autólogas o alogénicas.

35 [Párrafo 37] El método del párrafo 33, en el que dicha primera secuencia de ácido nucleico codifica un ARNip o ARNhp que tiene una región bicatenaria, comprendiendo dicha región bicatenaria una secuencia que es sustancialmente idéntica y complementaria de una secuencia de CCR5.

40 [Párrafo 38] El método del párrafo 37, en el que el ARNhp tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1.

[Párrafo 39] El método del párrafo 37, en el que dichas células hematopoyéticas transducidas expresan niveles reducidos de proteína CCR5 en comparación con células hematopoyéticas no transducidas.

45 [Párrafo 40] El método del párrafo 33, en el que dicha segunda secuencia de ácido nucleico codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en TRIM5 α humana, TRIM5 α de rhesus, TRIM5 α quimérica, una proteína de fusión de ciclofilina-TRIM5 humana y una proteína C46.

50 [Párrafo 41] El método del párrafo 40, en el que la TRIM5 α quimérica comprende un dominio amino terminal de una proteína TRIM5 α humana y un dominio PRYSPRY carboxilo terminal de una proteína TRIM5 α de rhesus.

[Párrafo 42] El método del párrafo 40, en el que dichas células hematopoyéticas transducidas expresan niveles aumentados de dicha proteína en comparación con células hematopoyéticas no transducidas.

55 [Párrafo 43] El método del párrafo 35, en el que dichos granulocitos, monocitos/macrófagos y linfocitos son resistentes a infección por cepas de VIH R4 y X4 trópicas.

[Párrafo 44] El método del párrafo 43, en el que dichos granulocitos, monocito/macrófagos y linfocitos son resistentes a infección por cepas de VIH resistentes a HAART.

60 [Párrafo 45] El método del párrafo 33, en el que el paciente no se ha expuesto previamente a HAART.

[Párrafo 46] El método del párrafo 33, en el que el paciente recibe un régimen de HAART.

[Párrafo 47] El método del párrafo 33, en el que el paciente está fracasando o ha fracasado en un régimen de HAART.

65 [Párrafo 48] Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del vector de expresión del párrafo 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[Párrafo 49] Uso de una composición farmacéutica del párrafo 48 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente infectado por VIH.

5 [Párrafo 50] Un método para tratar o prevenir infección por VIH en un paciente que comprende administrar la composición farmacéutica del párrafo 48 al paciente.

[Párrafo 51] El método del párrafo 50, en el que el paciente es resistente a infección por cepas de VIH R5 y X4 trópicas después de administración de la composición.

10 [Párrafo 52] El método del párrafo 51, en el que el paciente es resistente a infección por cepas de VIH resistentes a HAART después de administración de la composición.

15 [Párrafo 53] El método del párrafo 50, en el que el paciente no se ha expuesto previamente a HAART.

[Párrafo 54] El método del párrafo 50, en el que el paciente está recibiendo un régimen de HAART.

20 [Párrafo 55] El método del párrafo 50, en el que el paciente está fracasando o ha fracasado en un régimen de HAART.

[Párrafo 56] El método del párrafo 50, en el que el paciente está en riesgo de infección por VIH.

25 [Párrafo 57] Uso de un vector de expresión vírica del párrafo 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente infectado con VIH.

[Párrafo 58] Un método para producir un vector de expresión vírica que, cuando está presente en una célula, es capaz de inhibir la unión de VIH con la célula y evitar la fusión de VIH en la célula o replicación de VIH, comprendiendo el método:

30 sintetizar un ADNc de un gen que expresa una proteína capaz de prevenir la fusión de VIH en una célula o replicación de VIH;
clonar el ADNc sintetizado en un sitio de restricción en un vector vírico; e
insertar una unidad de expresión capaz de regular negativamente la expresión de un correceptor de VIH en un sitio de restricción en el vector.

35 [Párrafo 59] El método del párrafo 58, en el que el ADNc es un ADNc de C46 o ADNc de TRIM5 α , y la unidad de expresión es un ARNhp que se dirige a CCR5.

40 [Párrafo 60] El método del párrafo 59, en el que el ARNhp tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1.

[Párrafo 61] El método del párrafo 59, en el que el vector vírico es un vector lentivírico de FG 11F.

45 [Párrafo 62] El método del párrafo 61, en el que el ADNc de C46 o TRIM5 α se clona en los sitios de restricción BamHI y EcoRI de un vector FG11F.

[Párrafo 63] El método del párrafo 62, en el que el ARNhp se inserta entre sitios de restricción XbaI/XhoI del vector FG11F.

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> Callimmune Inc.
Chen, Irvin
An, Dong Sung
Millington, Michelle
55 Boyd, Maureen
Symonds, Geoff
Breton, Louis

60 <120> VECTOR DUAL PARA INHIBICIÓN DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

<130> CALI-004/01WO

<150> US 61/225.687

<151> 15-07-2009

65 <150> US 61/287.599

ES 2 657 737 T3

<151> 17-12-2009

<160> 5

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 51

<212> ARN

10 <213> Desconocido

<220>

<223> receptor CCR5 dirigido a ARNhp

15 <400> 1

gagcaagcuc aguuuacacc uuguccgacg guguaaacug agcuugcucu u 51

<210> 2

<211> 135

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Inhibidor de fusión de VIH C46

25

<400> 2

Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Arg Ser Trp Met
20 25 30

Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu
35 40 45

Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu
50 55 60

Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Arg Ser Glu Arg

65 70 75 80

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
85 90 95

Pro Leu Ile Ala Leu Val Thr Ser Gly Ala Leu Leu Ala Val Leu Gly
100 105 110

Ile Thr Gly Tyr Phe Leu Met Asn Arg Arg Ser Trp Ser Pro Thr Gly
115 120 125

Glu Arg Leu Glu Leu Glu Pro
130 135

ES 2 657 737 T3

<210> 3
 <211> 408
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Inhibidor de fusión de VIH C46
 10 <400> 3

 atgggagcag gagcaaccgg aagggcaatg gacggaccac ggctgctgct gctgctgctg 60
 ctgggcgtga gcctgggcgg cgcccggagc tggatggagt gggaccggga gatcaacaac 120
 tacaccagcc tgatccacag cctgatcgag gagagccaga accagcagga gaagaacgag 180
 caggagctgc tggagctgga caagtgggcc agcctgtgga actggttccg gagcgagcgg 240
 aagtgctgcg tggagtgcc accatgccca gcaccaccag tggcaggacc cctgatcgca 300
 ctggtgacca gcggagccct gctggccgtg ctgggcatca caggctactt cctgatgaac 360
 cggcggagct ggagccccac cggcgagcgg ctggagctgg agccctga 408

 <210> 4
 15 <211> 493
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 4
 20
 Met Ala Ser Gly Ile Leu Val Asn Val Lys Glu Glu Val Thr Cys Pro
 1 5 10 15

 Ile Cys Leu Glu Leu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Leu Asp Cys Gly His
 20 25 30

 Ser Phe Cys Gln Ala Cys Leu Thr Ala Asn His Lys Lys Ser Met Leu
 35 40 45

 Asp Lys Gly Glu Ser Ser Cys Pro Val Cys Arg Ile Ser Tyr Gln Pro

ES 2 657 737 T3

Pro Asn Asn Ile Ser Cys Ala Val Ile Ser Glu Asp Lys Arg Gln Val
305 310 315 320

Ser Ser Pro Lys Pro Gln Ile Ile Tyr Gly Ala Arg Gly Thr Arg Tyr
325 330 335

Gln Thr Phe Val Asn Phe Asn Tyr Cys Thr Gly Ile Leu Gly Ser Gln
340 345 350

Ser Ile Thr Ser Gly Lys His Tyr Trp Glu Val Asp Val Ser Lys Lys
355 360 365

Thr Ala Trp Ile Leu Gly Val Cys Ala Gly Phe Gln Pro Asp Ala Met
370 375 380

Cys Asn Ile Glu Lys Asn Glu Asn Tyr Gln Pro Lys Tyr Gly Tyr Trp
385 390 395 400

Val Ile Gly Leu Glu Glu Gly Val Lys Cys Ser Ala Phe Gln Asp Ser
405 410 415

Ser Phe His Thr Pro Ser Val Pro Phe Ile Val Pro Leu Ser Val Ile
420 425 430

Ile Cys Pro Asp Arg Val Gly Val Phe Leu Asp Tyr Glu Ala Cys Thr
435 440 445

Val Ser Phe Phe Asn Ile Thr Asn His Gly Phe Leu Ile Tyr Lys Phe
450 455 460

Ser His Cys Ser Phe Ser Gln Pro Val Phe Pro Tyr Leu Asn Pro Arg
465 470 475 480

Lys Cys Gly Val Pro Met Thr Leu Cys Ser Pro Ser Ser
485 490

<210> 5
<211> 1482
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

5

ES 2 657 737 T3

atggcttctg gaatcctggt taatgtaaag gaggaggtga cctgccccat ctgcctggaa 60
ctcctgacac aaccctgag cctggactgc ggccacagct tctgcccaagc atgcctcact 120
gcaaaccaca agaagtccat gctagacaaa ggagagagta gctgccctgt gtgccggatc 180
agttaccagc ctgagaacat acggcctaata cggcatgtag ccaacatagt ggagaagctc 240
agggaggtca agttgagccc agaggggcag aaagttgatc attgtgcacg ccatggagag 300
aaacttctac tcttctgtca ggaggacggg aaggtcattt gctggctttg tgagcggctc 360
caggagcacc gtggtcacca cacgttcctc acagaggaggt ttgcccgga gtaccaagtg 420
aagctccagg cagctctgga gatgctgagg cagaagcagc aggaagctga agagttagaa 480
gctgacatca gagaagagaa agcttcctgg aagactcaaa tacagtatga caaaaccaac 540
gtcttggcag attttgagca actgagagac atcctggact gggaggagag caatgagctg 600
caaaacctgg agaaggagga ggaagacatt ctgaaaagcc ttacgaactc tgaaactgag 660
atggtgcagc agaccagtc cctgagagag ctcatctcag atctggagca tccgctgcag 720
gggtcagtg tggagctgct tcagggtgtg gatggcgtca taaaaaggac ggagaacgtg 780
acottgaaga agccagaaac ttttccaaa aatcaaagga gagtgtttcg agctcctgat 840
ctgaaaggaa tgctagaagt gtttagagag ctgacagatg tccgacgcta ctgggttgat 900
gtgacagtgg ctccaaacaa catttcatgt gctgtcattt ctgaagataa gagacaagtg 960
agctctccga aaccacagat aatatatggg gcacgaggga caagatacca gacatttgtg 1020
aatttcaatt attgtactgg catcctgggc tctcaaagta tcacatcagg gaaacattac 1080
tgggaggtag acgtgtccaa gaaaactgct tggatcctgg gggatgtgc tggcttccaa 1140
cctgatgcaa tgtgtaatat tgaaaaaat gaaaattatc aacctaaata cggctactgg 1200
gttataggtg tagaggaagg agttaaatgt agtgctttcc aggatagttc cttccatact 1260
ccttctgttc ctttcattgt gccctctct gtgattattt gtctgatcg tgttggagtt 1320
ttcctagact atgaggcttg cactgtctca ttcttcaata tcacaaacca tggatttctc 1380
atctataagt tttctcactg ttcttttct cagcctgat ttccatattt aaatcctaga 1440
aaatgtggag tccccatgac tctgtgctca ccaagctctt ga 1482

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un vector de expresión vírica que, cuando está presente en una célula, es capaz de inhibir la unión del VIH con la célula y evitar la fusión del VIH en la célula, comprendiendo el método:
- 5 insertar en el vector una primera molécula de ácido nucleico que codifica un ácido nucleico inhibidor capaz de regular negativamente la expresión de un correceptor de VIH, en donde el ácido nucleico inhibidor es un ARN de interferencia pequeño (ARNip) o un ARN en horquilla corto (ARNhp) que tiene una región bicatenaria; e insertar en el vector una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una proteína inhibidora de fusión de VIH.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho vector de expresión vírica es un vector lentivírico o un vector retrovírico.
3. El método de la reivindicación 2, en el que dicho vector lentivírico es autoinactivante.
- 15 4. El método de la reivindicación 2, en el que el vector lentivírico es un vector lentivírico FG11F que tiene una cadena principal de acuerdo con la Figura 2.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína inhibidora de fusión de VIH es una proteína C46, una proteína T20, enfuvirtida, CP₃₂M o sifuvirtida.
- 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho correceptor de VIH es CCR5 o CXCR4.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el ARNhp tiene una secuencia de SEQ ID NO: 1.
8. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína inhibidora de fusión de VIH es una proteína C46 y en el que el ácido nucleico inhibidor es un ARNhp que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.
- 30 9. El método de la reivindicación 1, en el que la primera molécula de ácido nucleico está unida operativamente a un primer promotor y la segunda molécula de ácido nucleico está unida operativamente a un segundo promotor.
10. El método de la reivindicación 9, en el que dicho primer promotor es un promotor de ARN polimerasa III y en el que dicho segundo promotor es un promotor de ARN polimerasa II.
- 35 11. El método de la reivindicación 10, en el que el promotor de ARN polimerasa III es un promotor de H1 pol III.
12. El método de la reivindicación 10, en el que el promotor de ARN polimerasa II es un promotor de Ubiquitina C pol II.
- 40 13. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de insertar en el vector una tercera molécula de ácido nucleico que codifica un inhibidor de replicación vírica de VIH.
14. El método de la reivindicación 13, en el que el inhibidor de replicación de VIH se selecciona del grupo que consiste en TRIM5 α humana, TRIM5 α de rhesus, TRIM5 α quimérica, una proteína de fusión de ciclofilina-TRIM5 humana, ciclofilina, ubiquitina E3, APOBEC3G y antígeno 2 de célula del estroma de médula ósea (BST-2).
- 45 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector lentivírico comprende secuencias R y U5 de la 5' LTR de un lentivirus y una 3'LTR inactivada o auto-inactivada de un lentivirus.

FIGURA 1

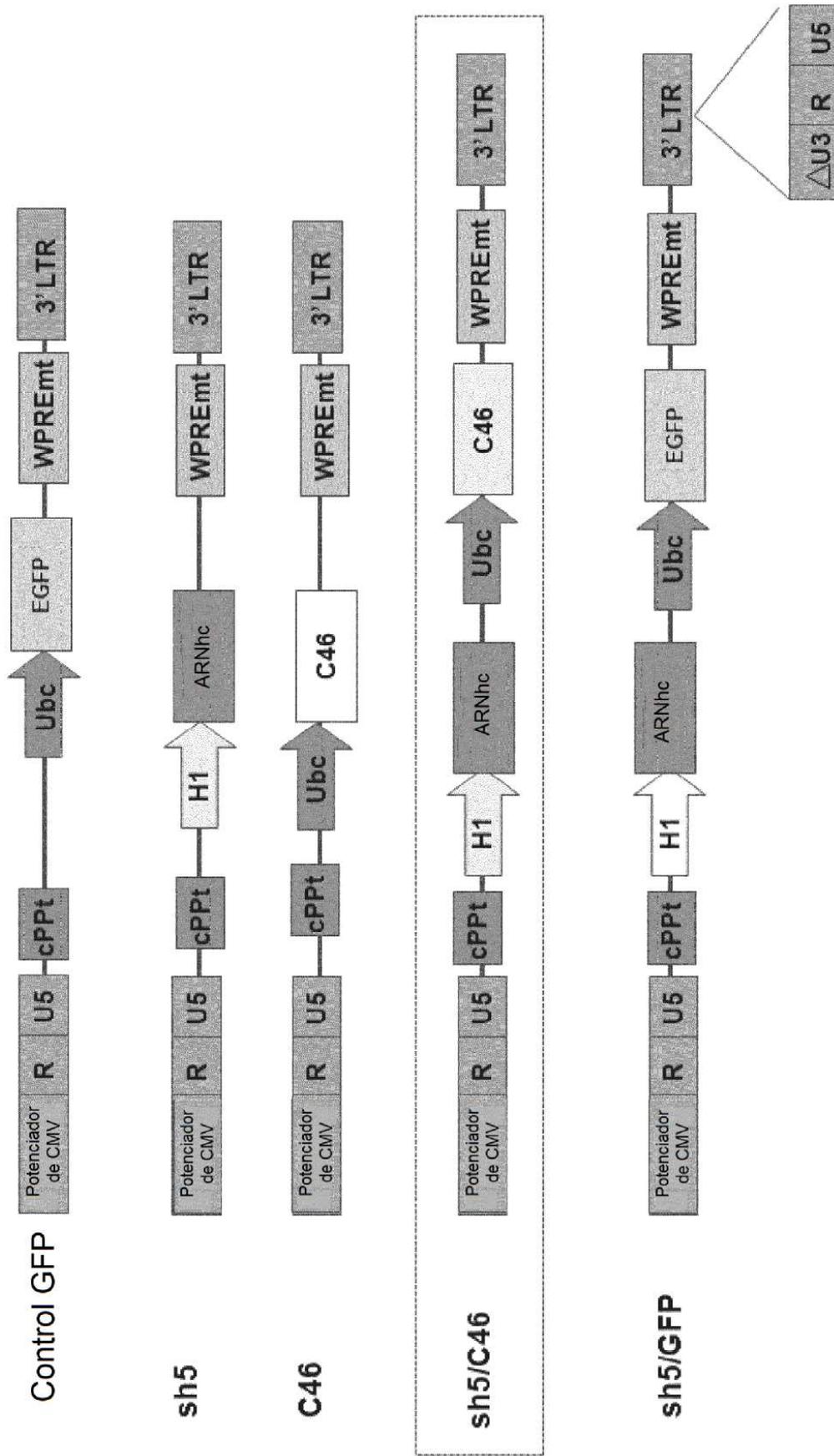


FIGURA 2

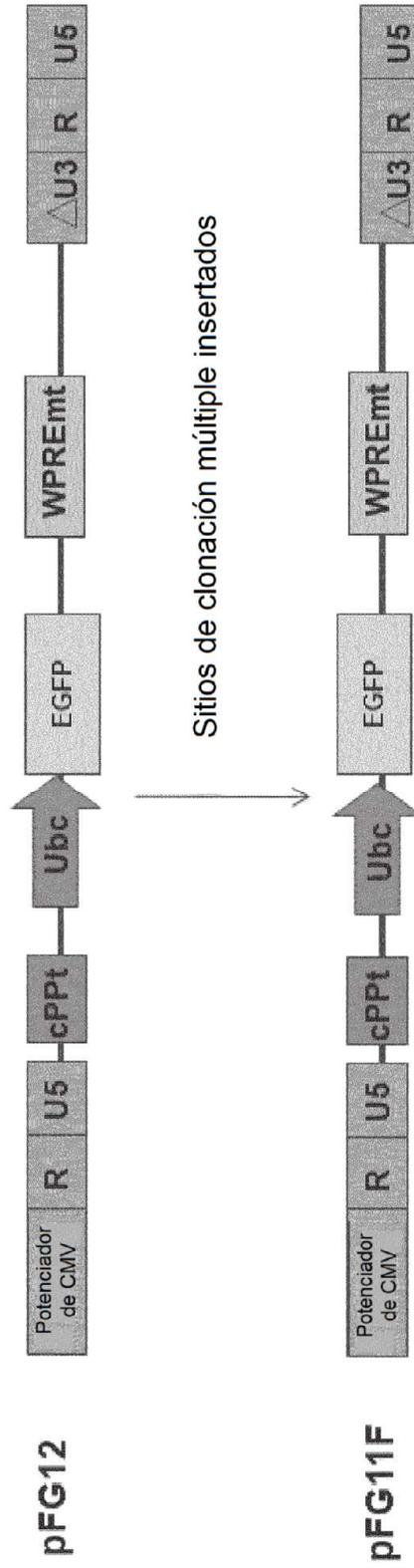


FIGURA 3

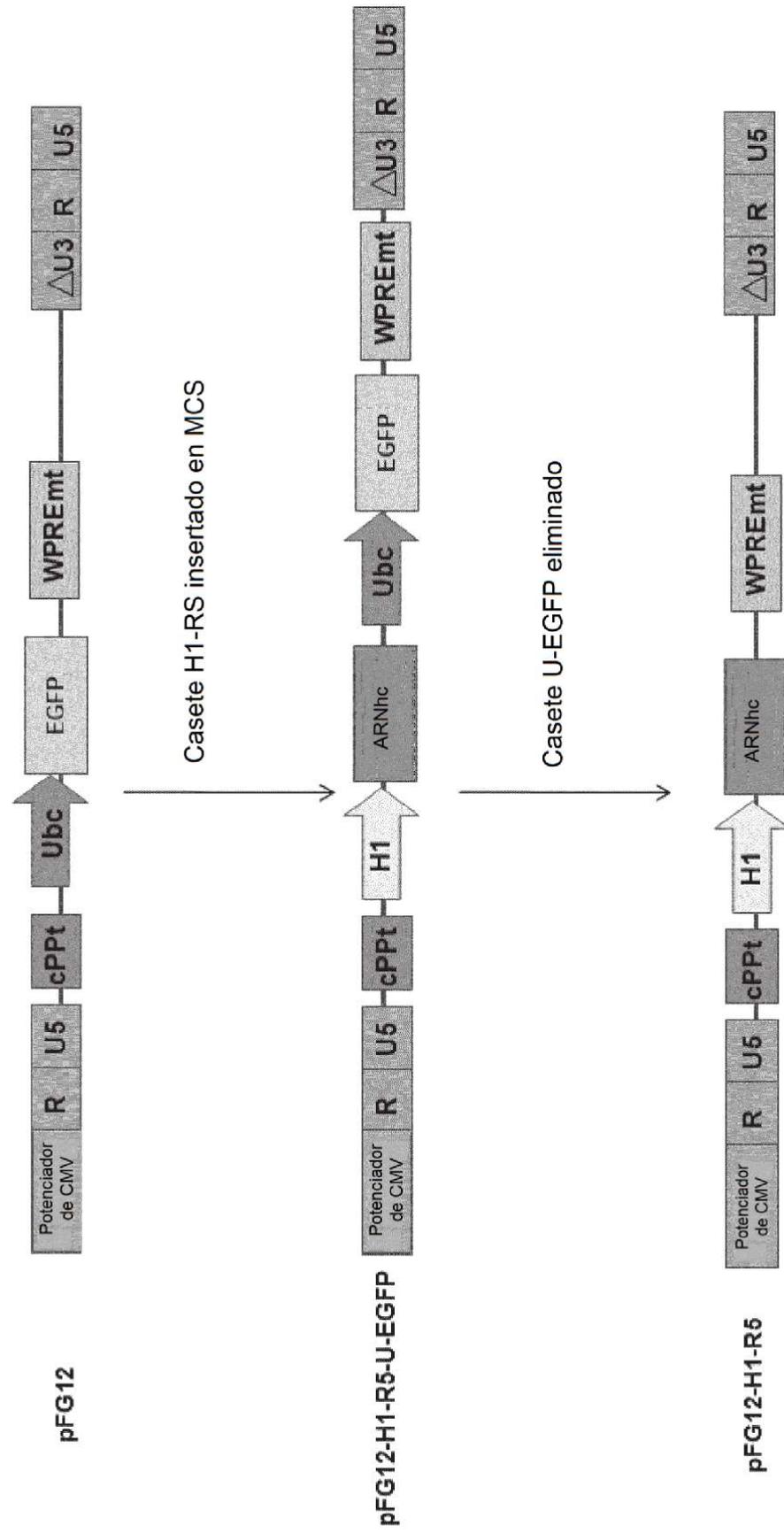


FIGURA 4

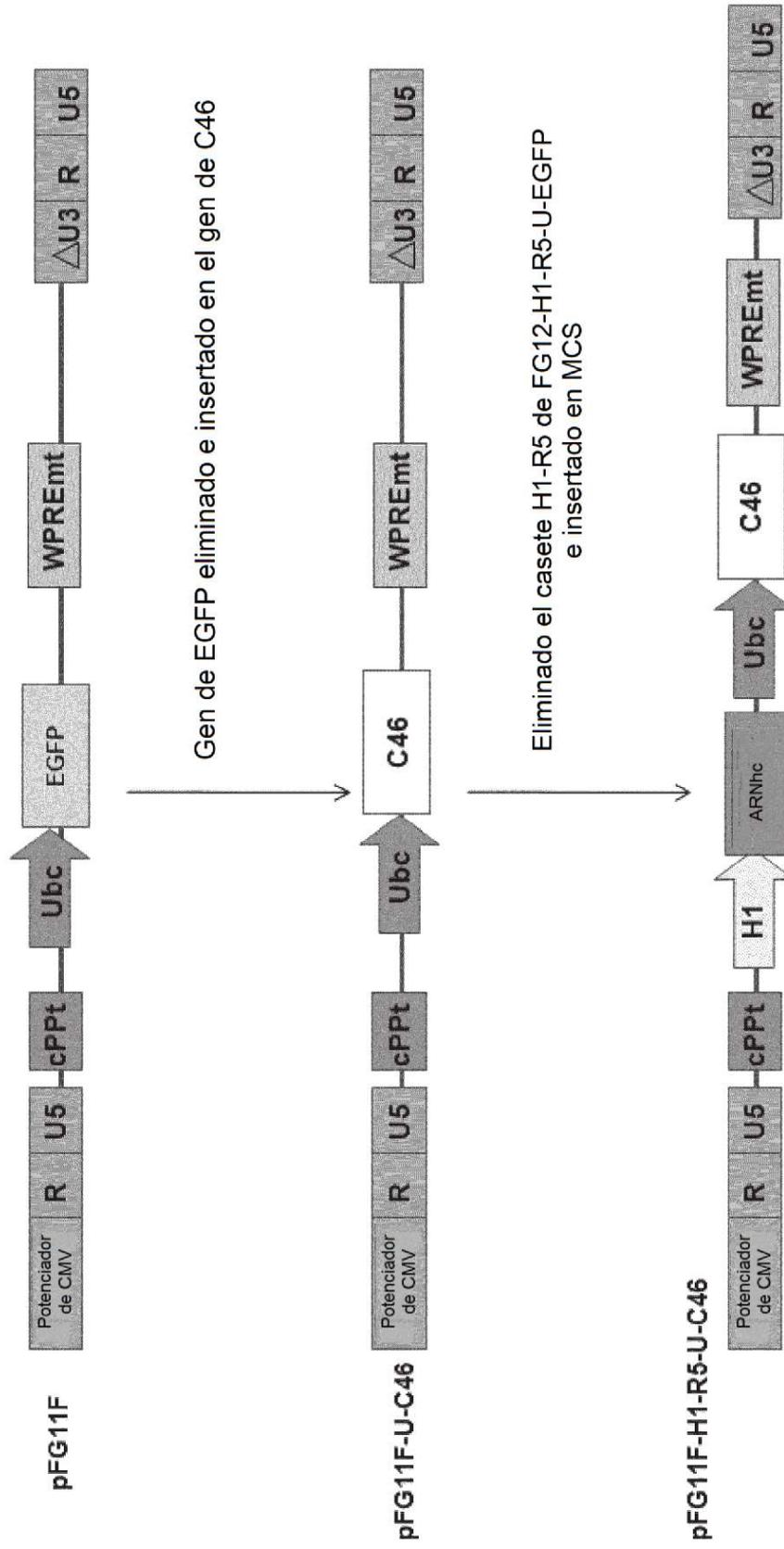
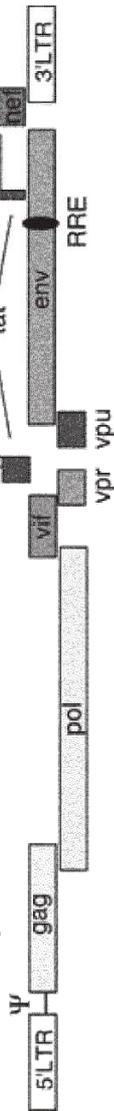


FIGURA 5

Genoma de tipo silvestre de VIH-1



1. Plásmido de vector de VIH



2. Empaquetamiento de VIH o plásmido auxiliar



3. Plásmido rev de VIH



4. Plásmido de envuelta

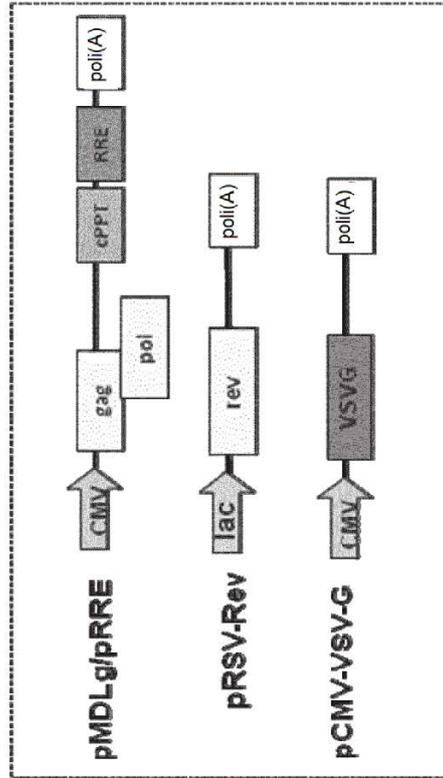


FIGURA 6

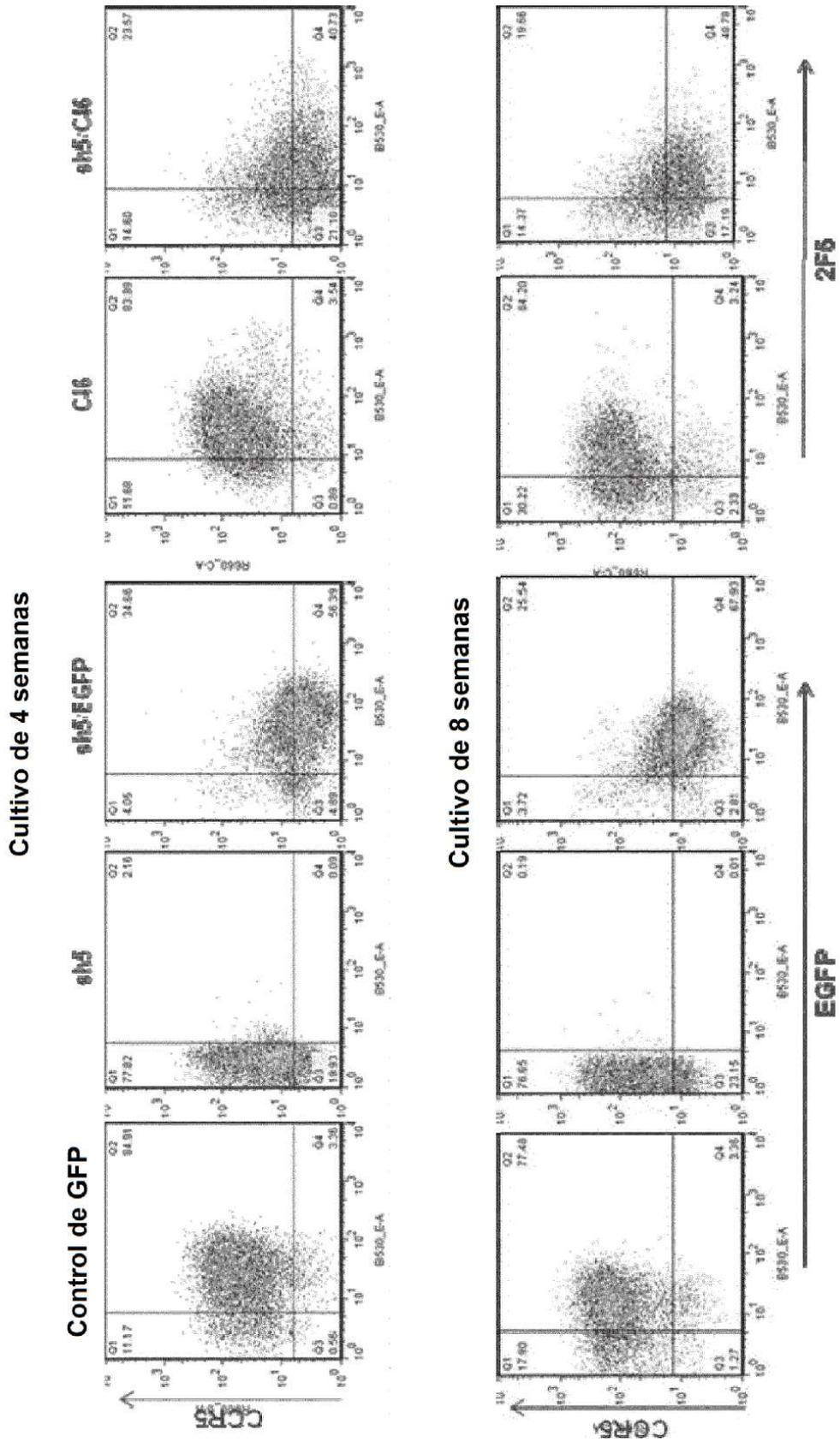
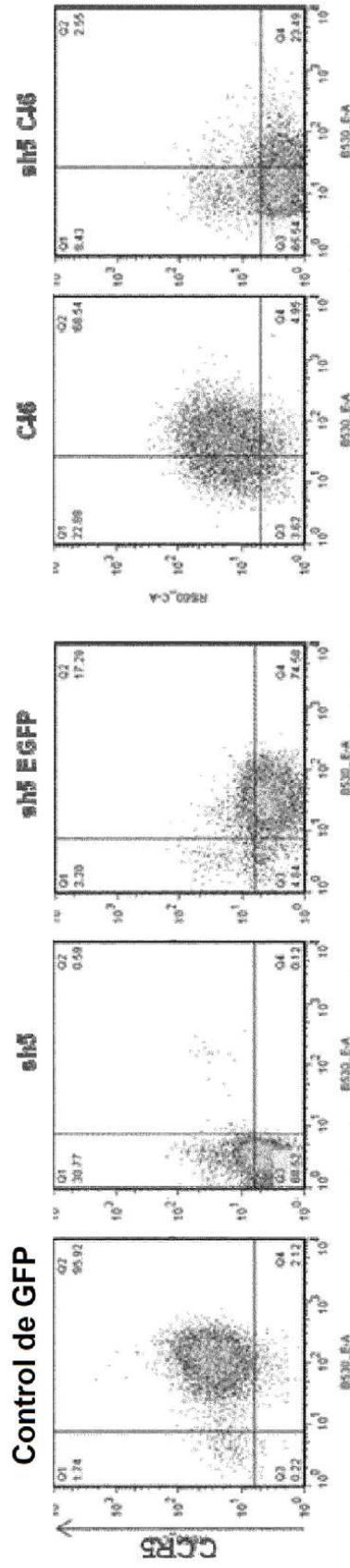


FIGURA 7

Cultivo de 4 semanas



Cultivo de 8 semanas

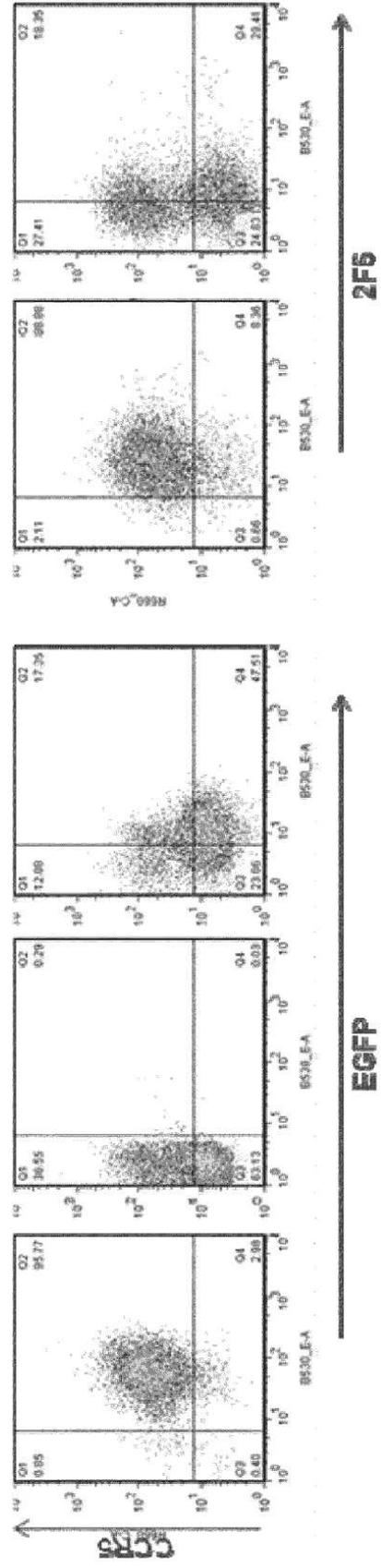


FIGURA 8

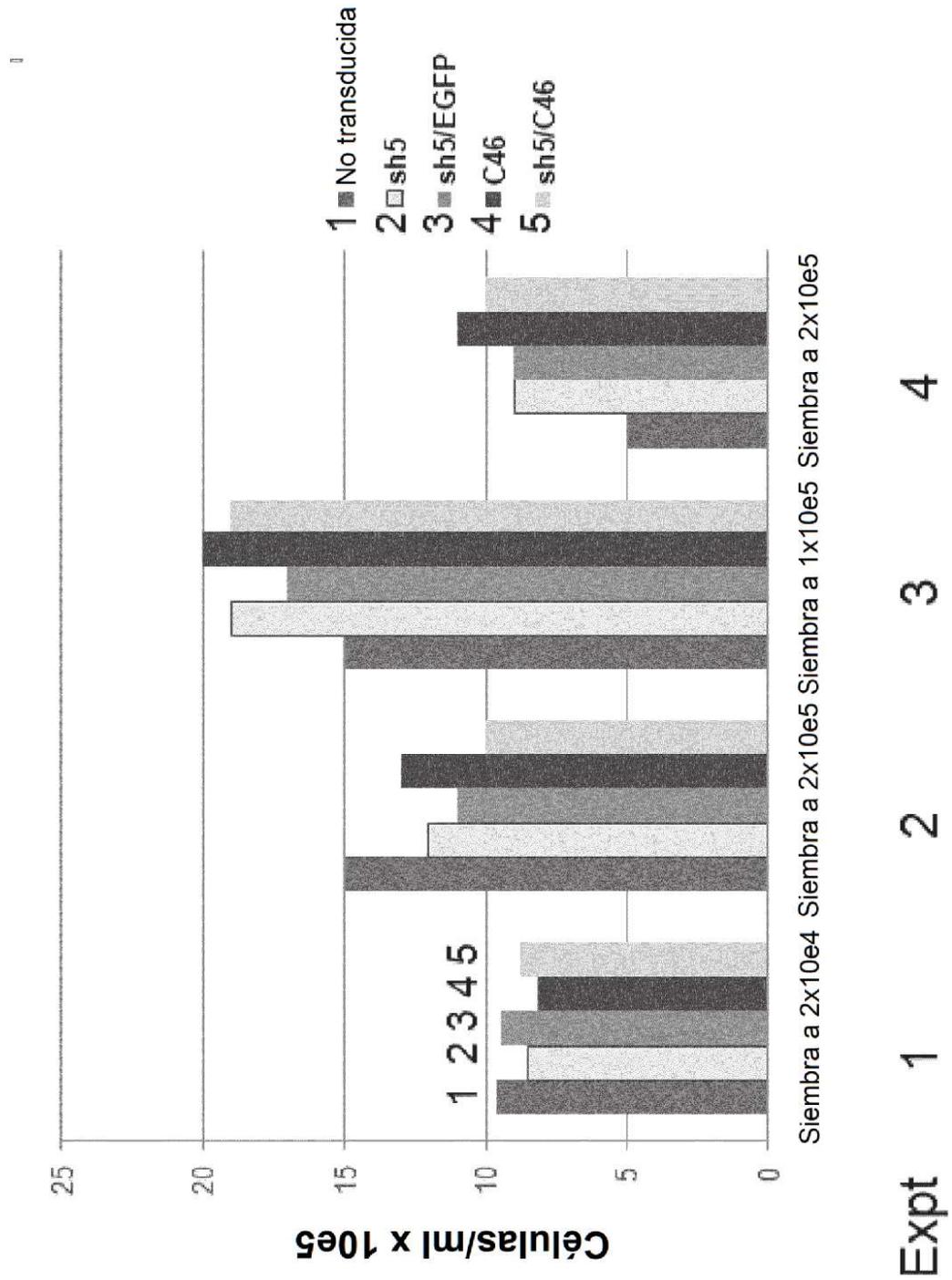


FIGURA 9

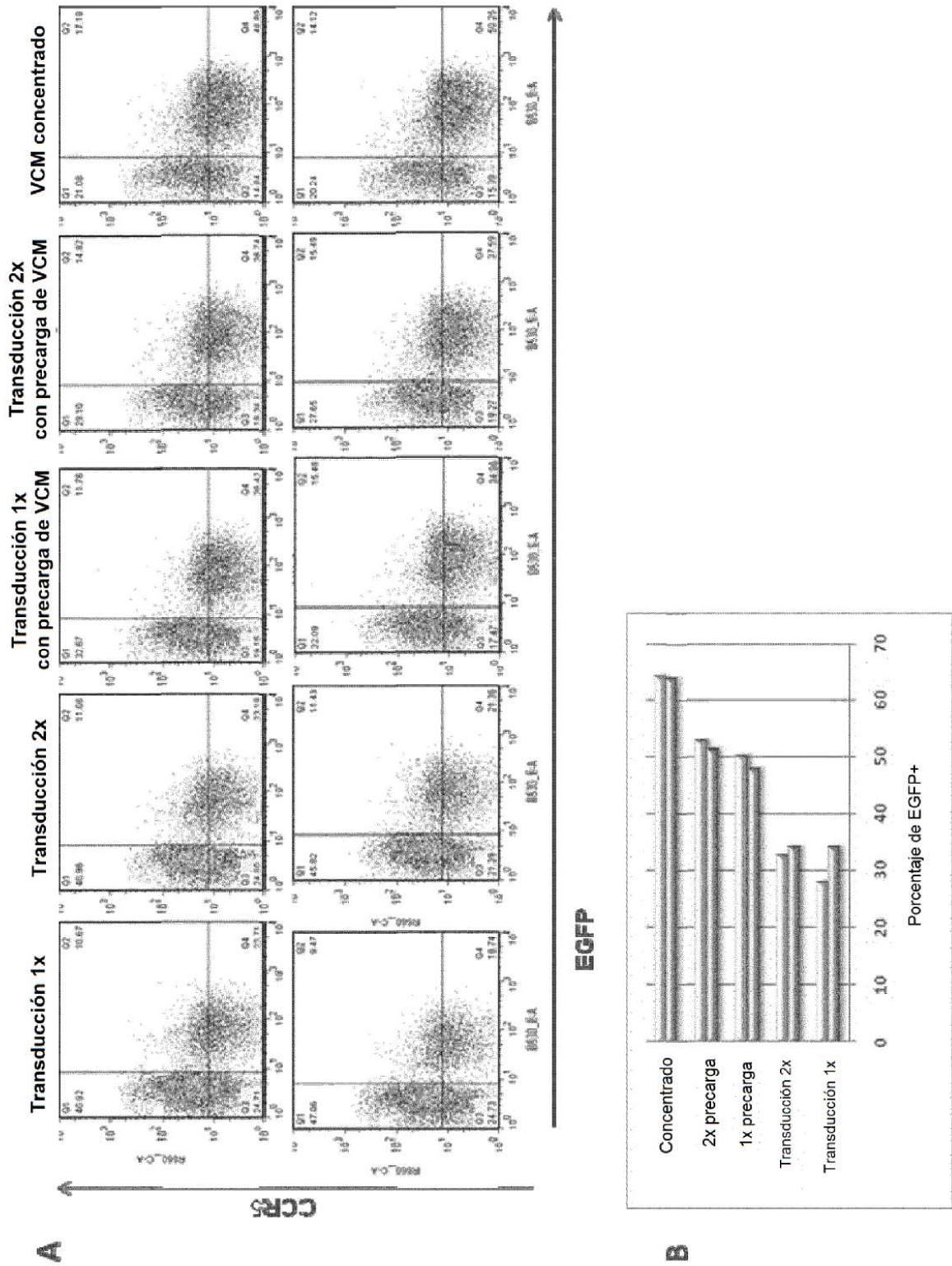


FIGURA 10

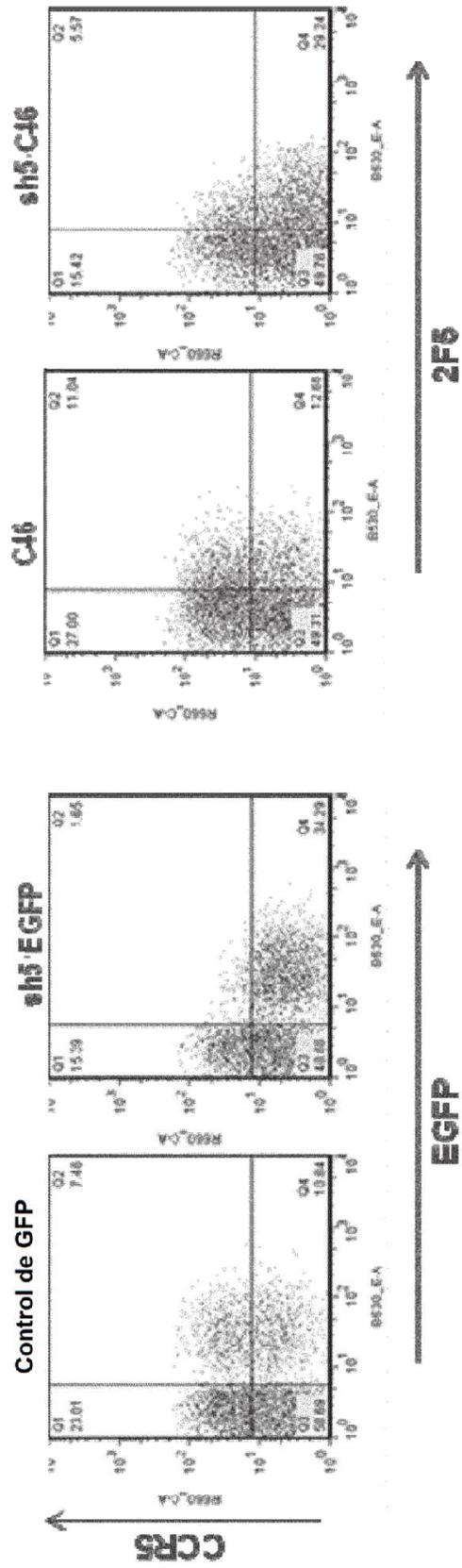


FIGURA 11

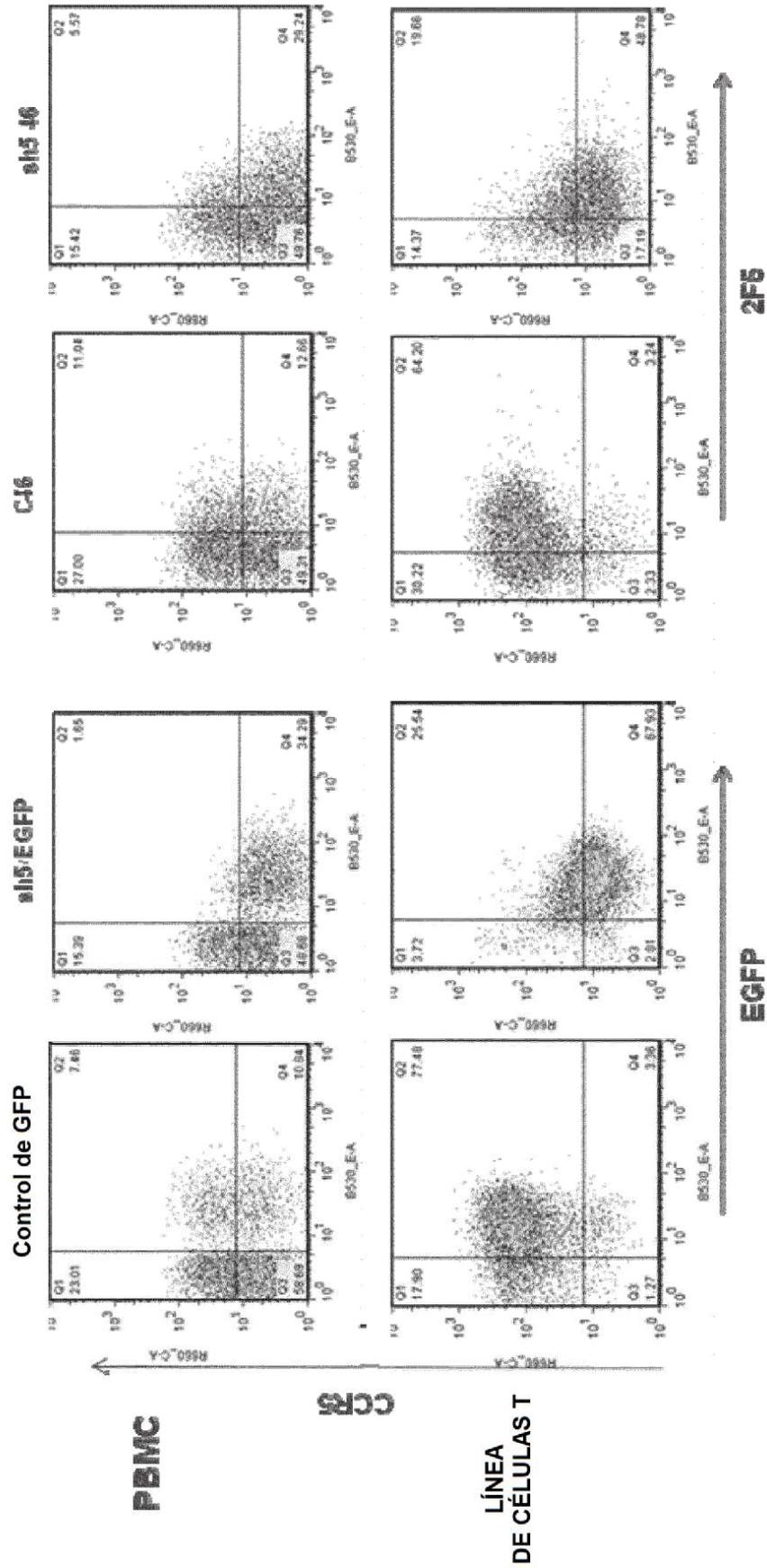


FIGURA 12

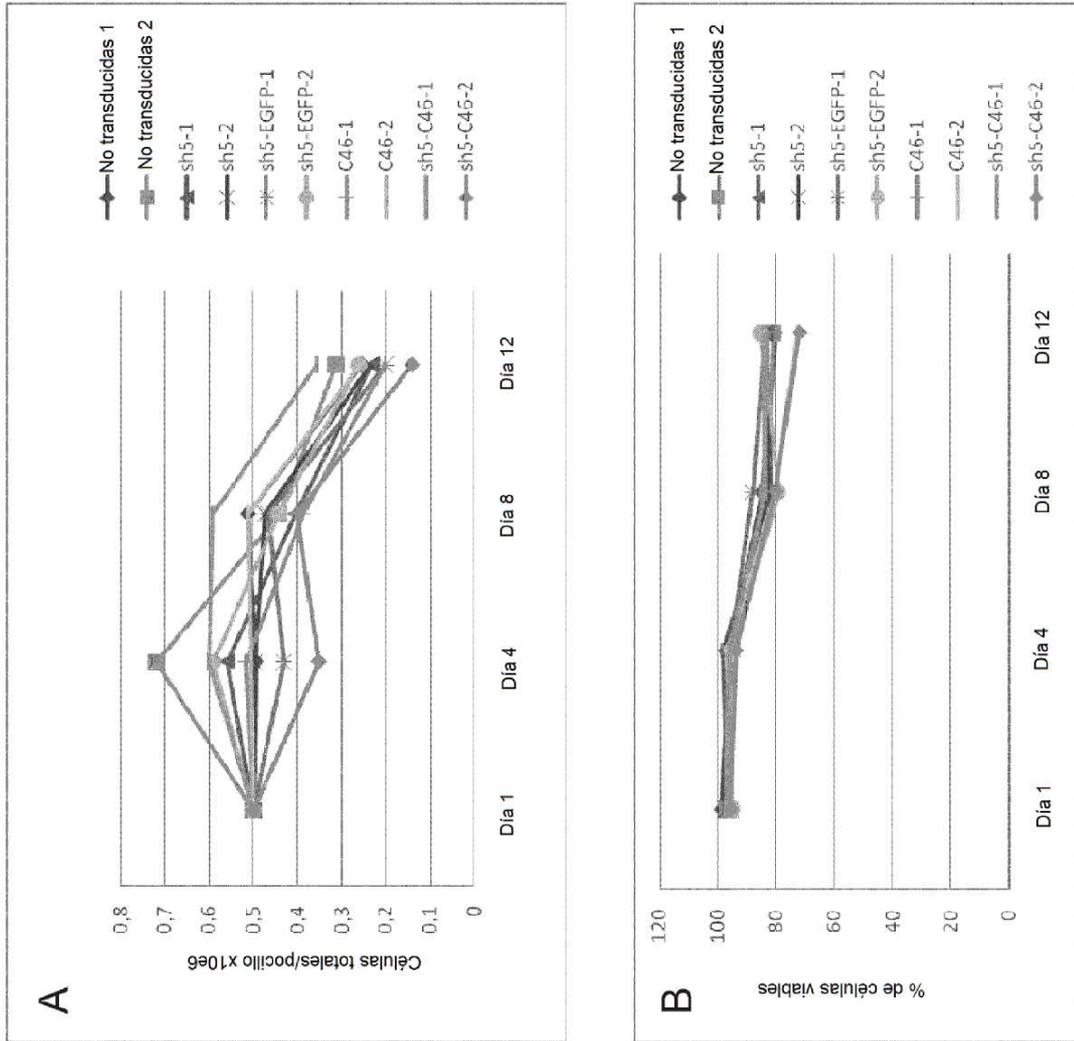


FIGURA 13

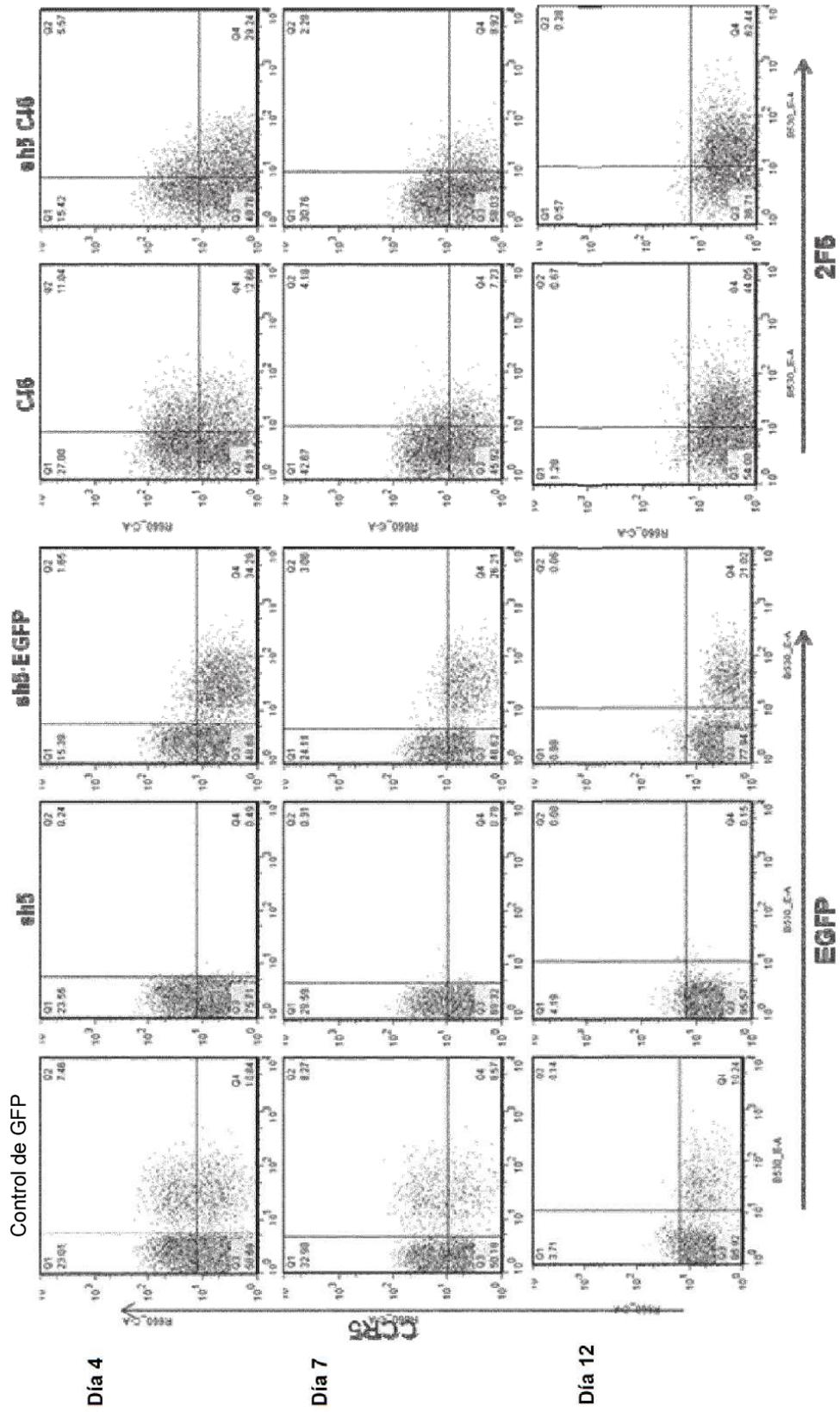


FIGURA 14

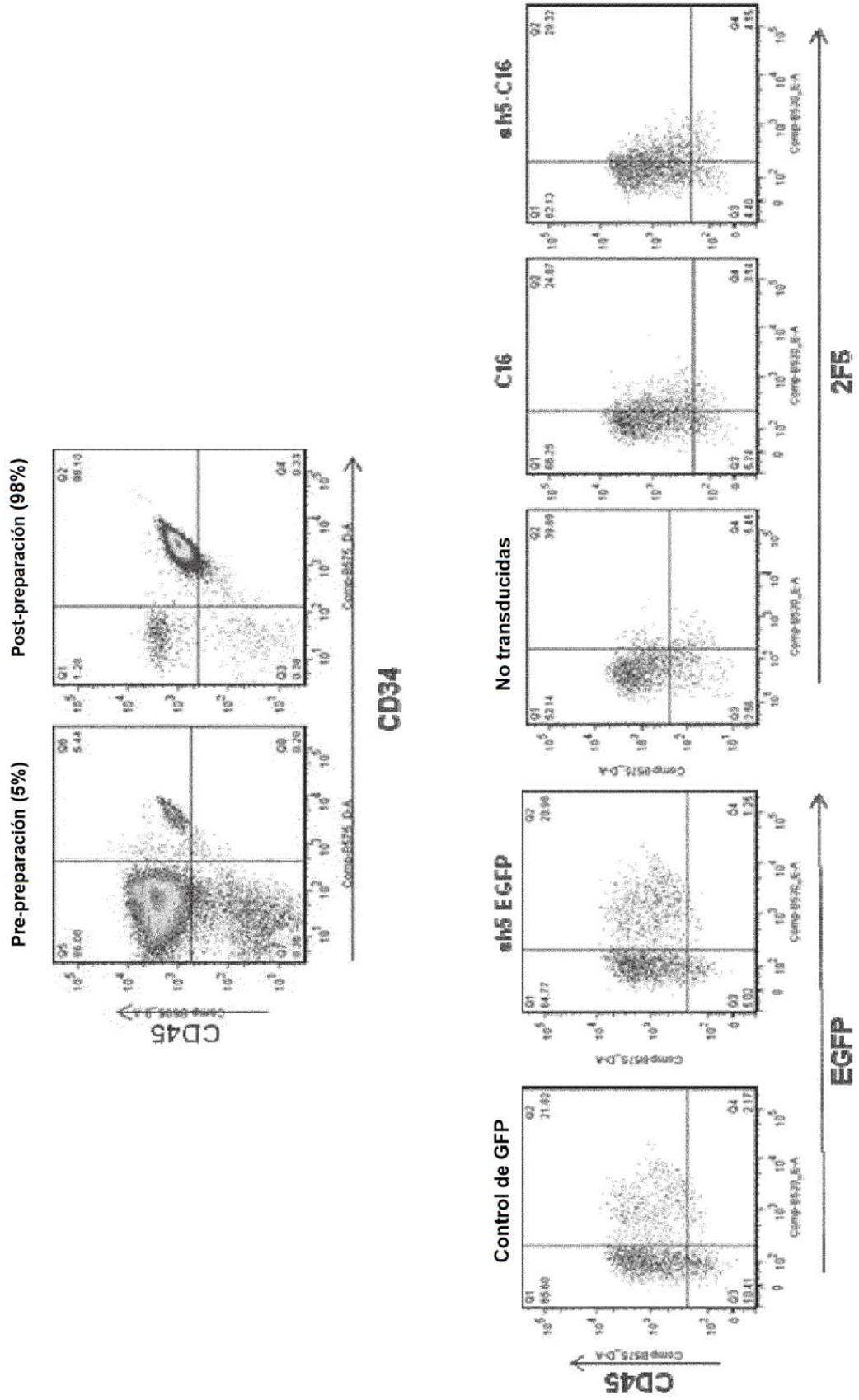


FIGURA 15

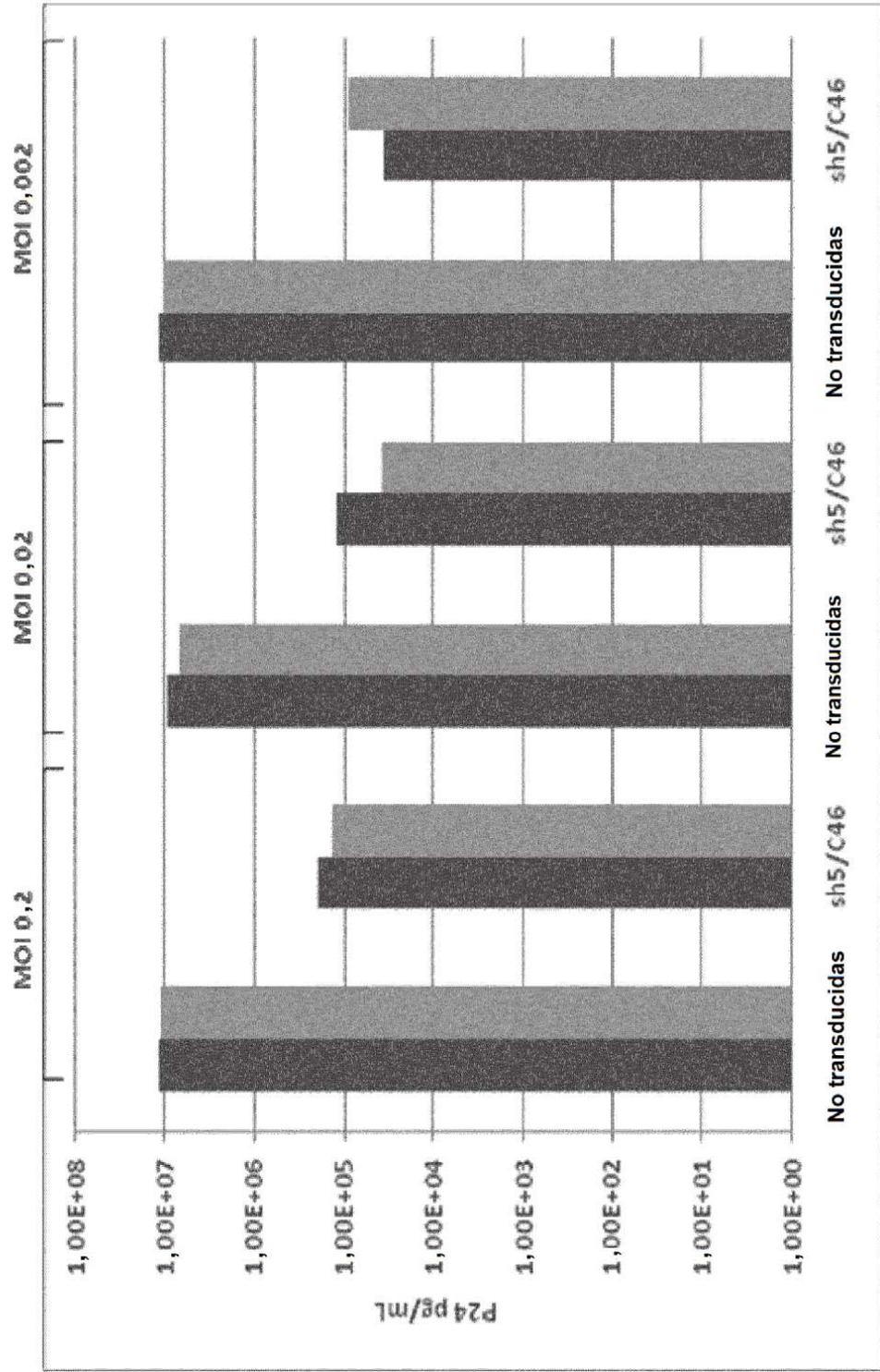


FIGURA 16

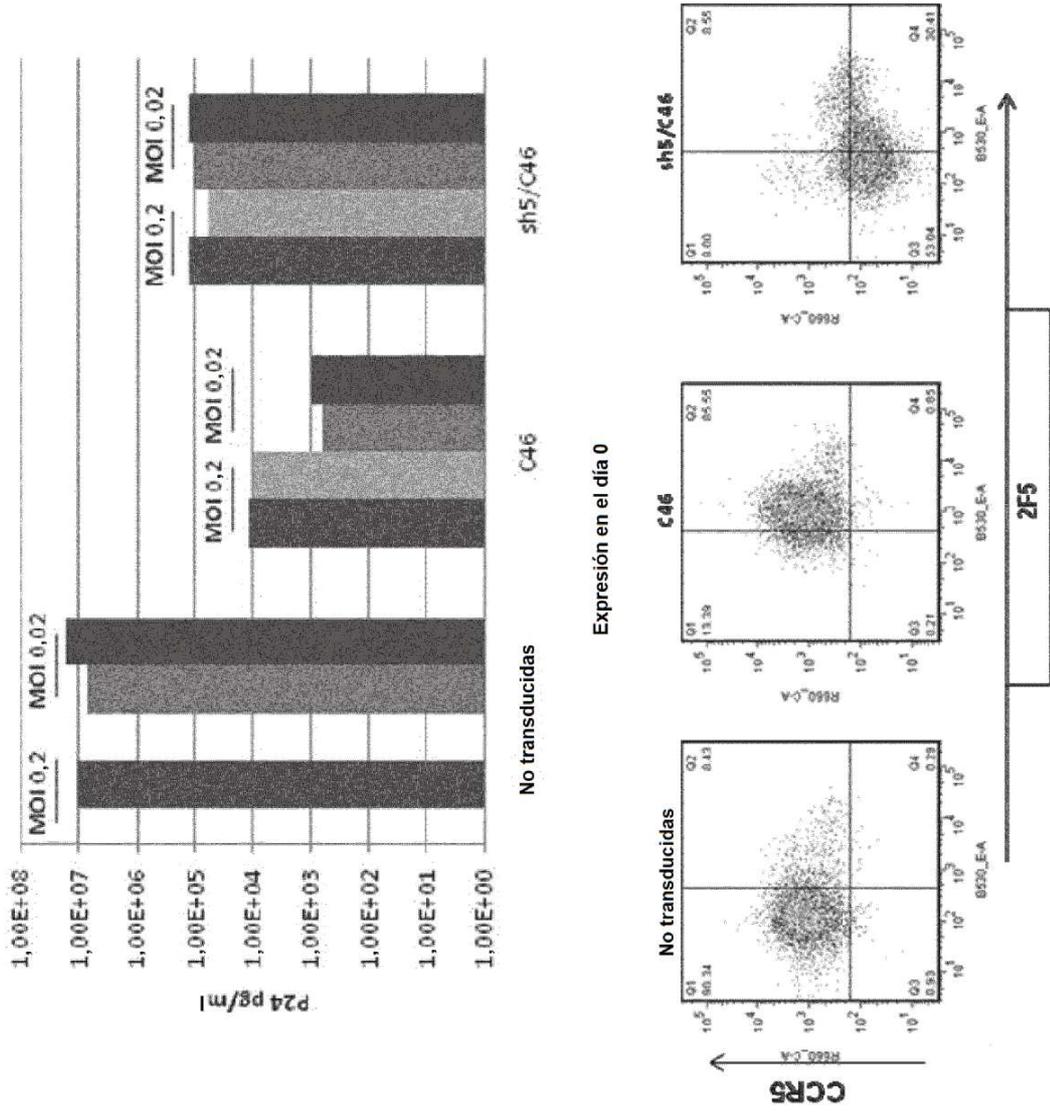


FIGURA 17

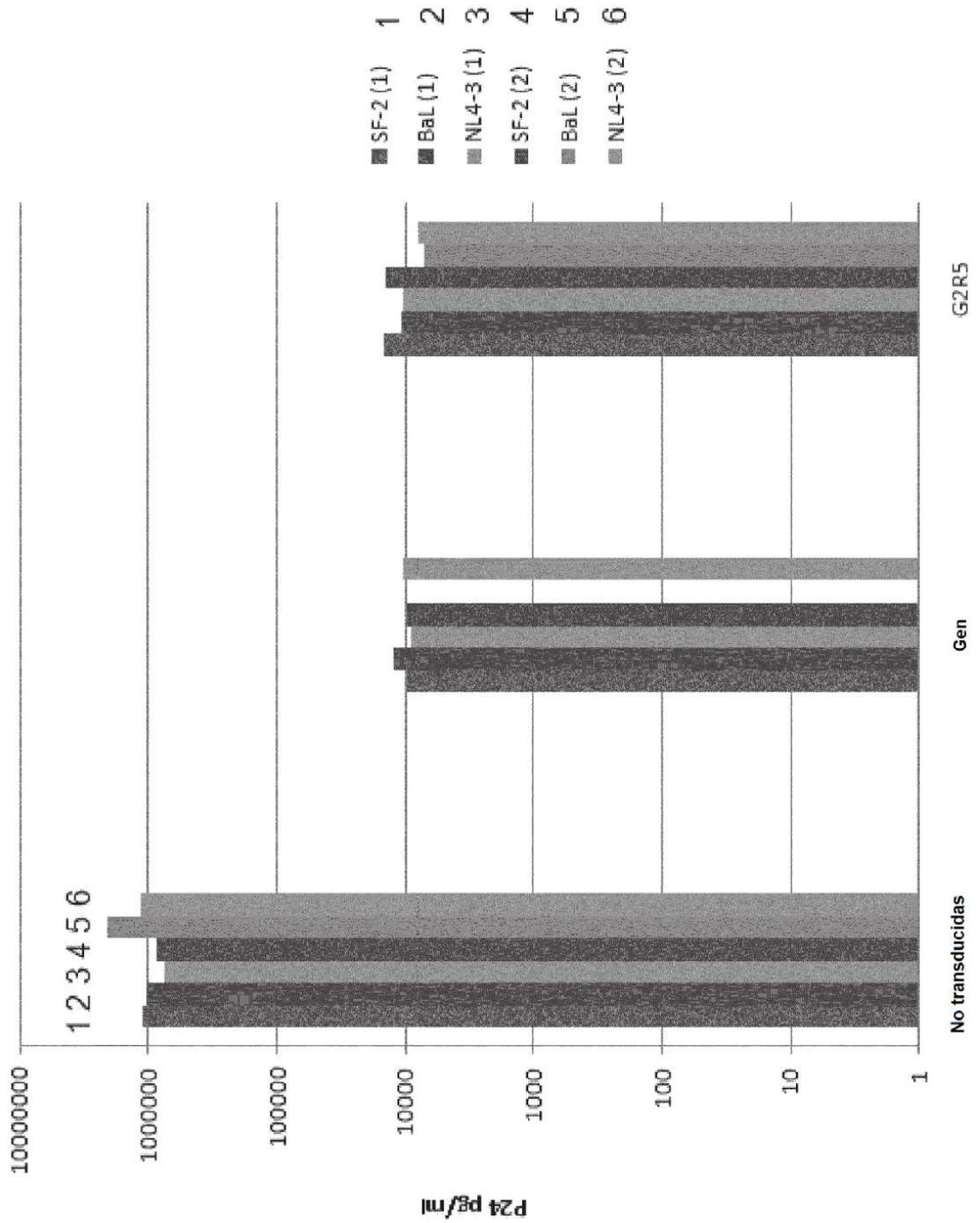


FIGURA 18

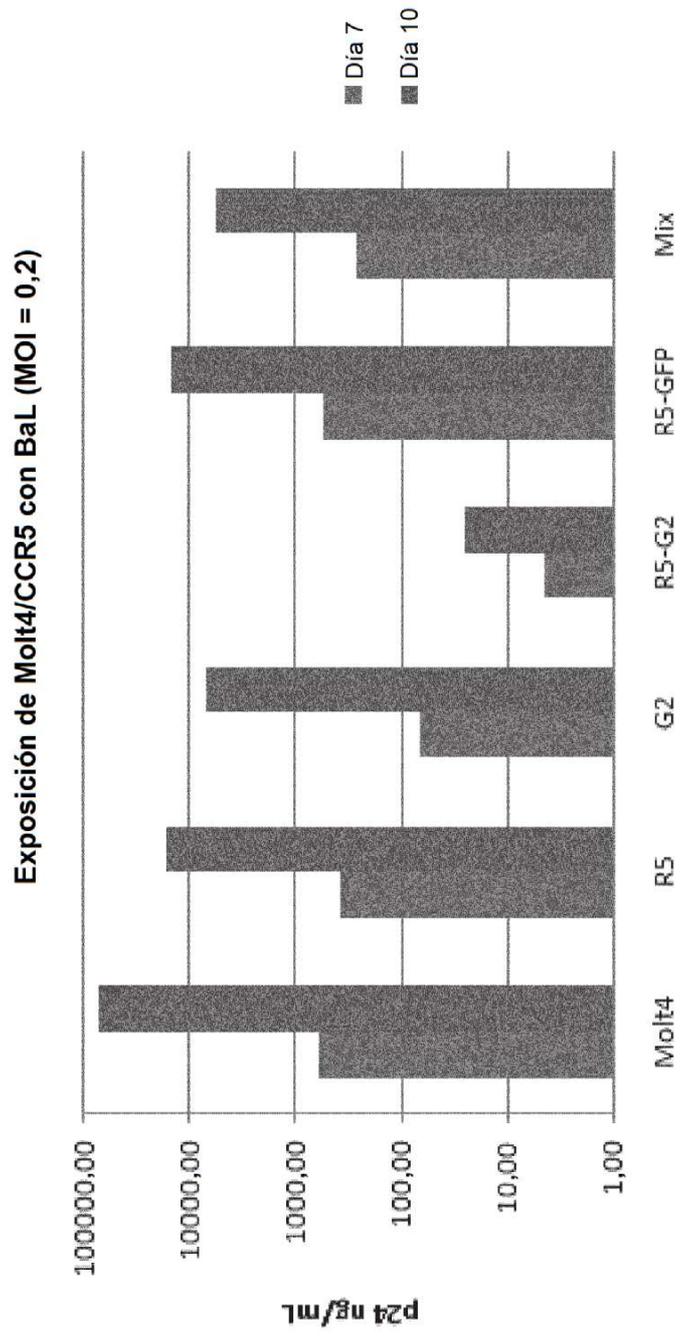


FIGURA 19

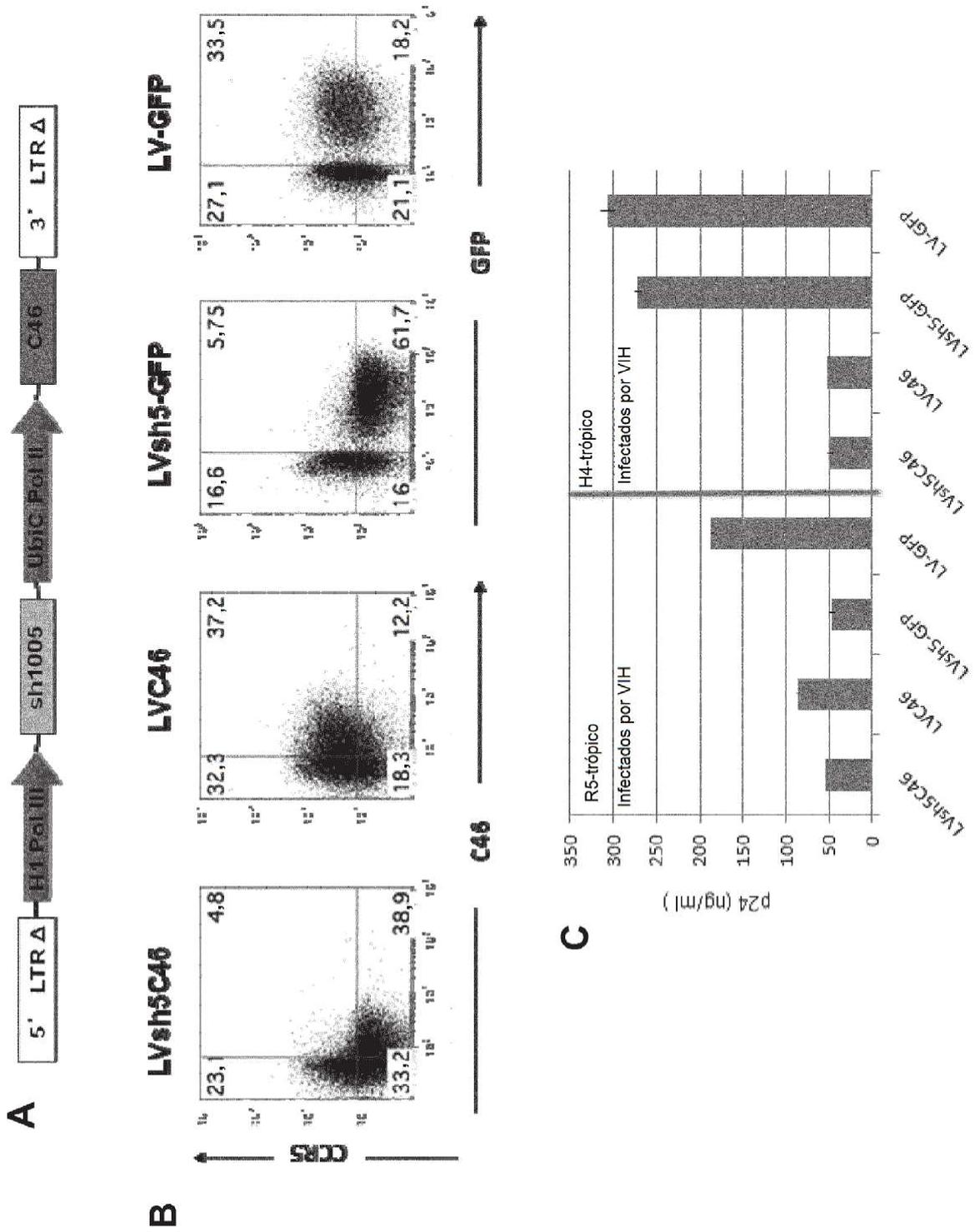


FIGURA 20

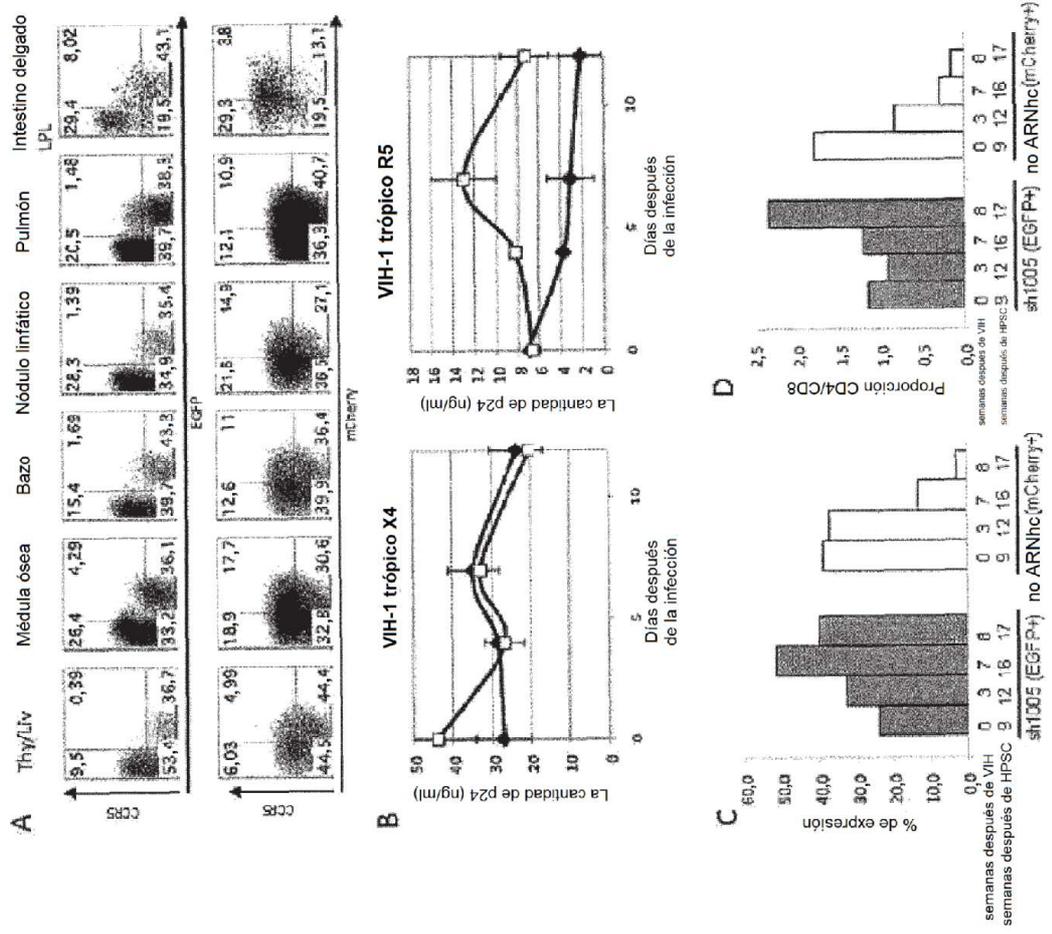


FIGURA 21

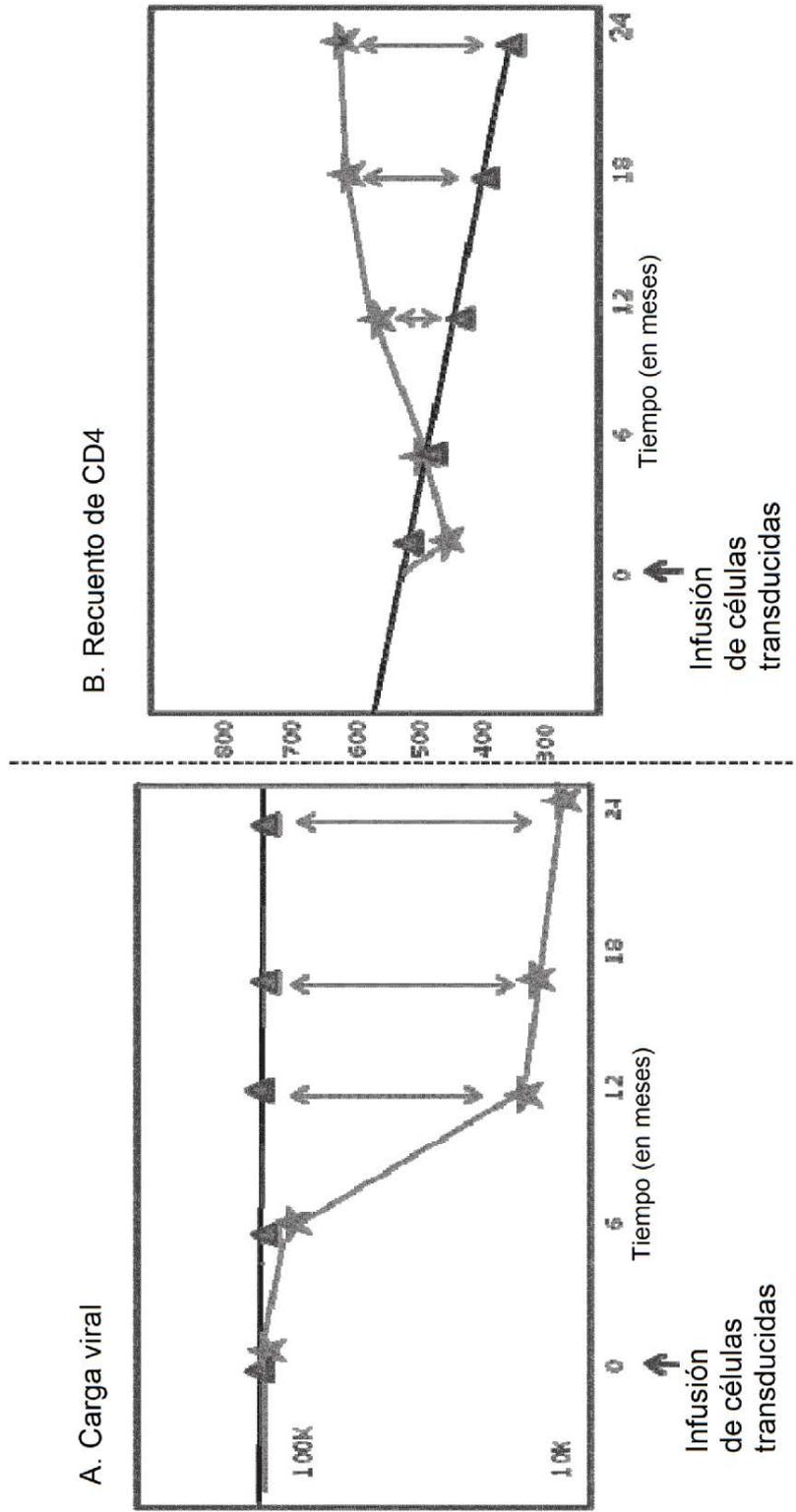


FIGURA 22

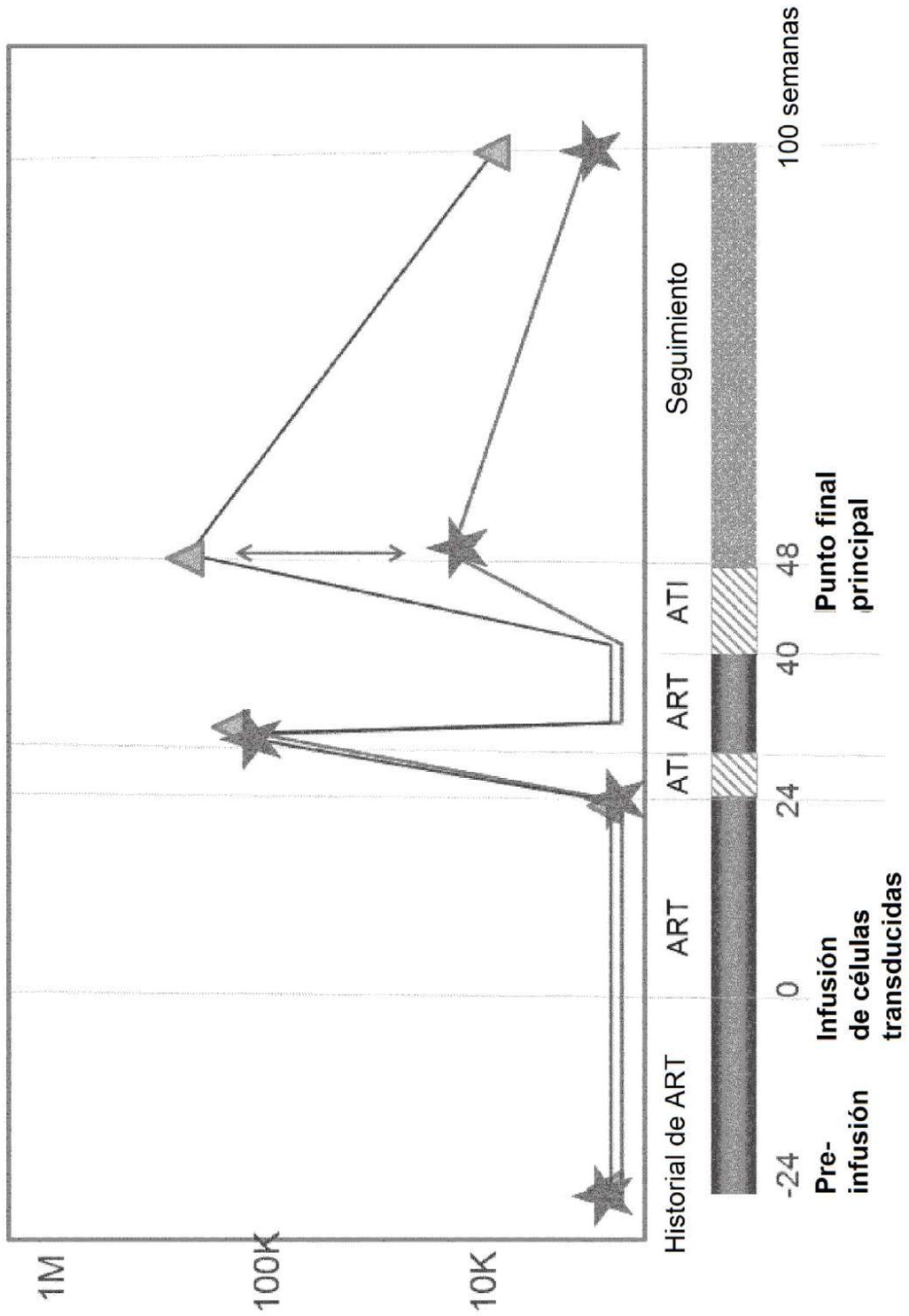


FIGURA 23

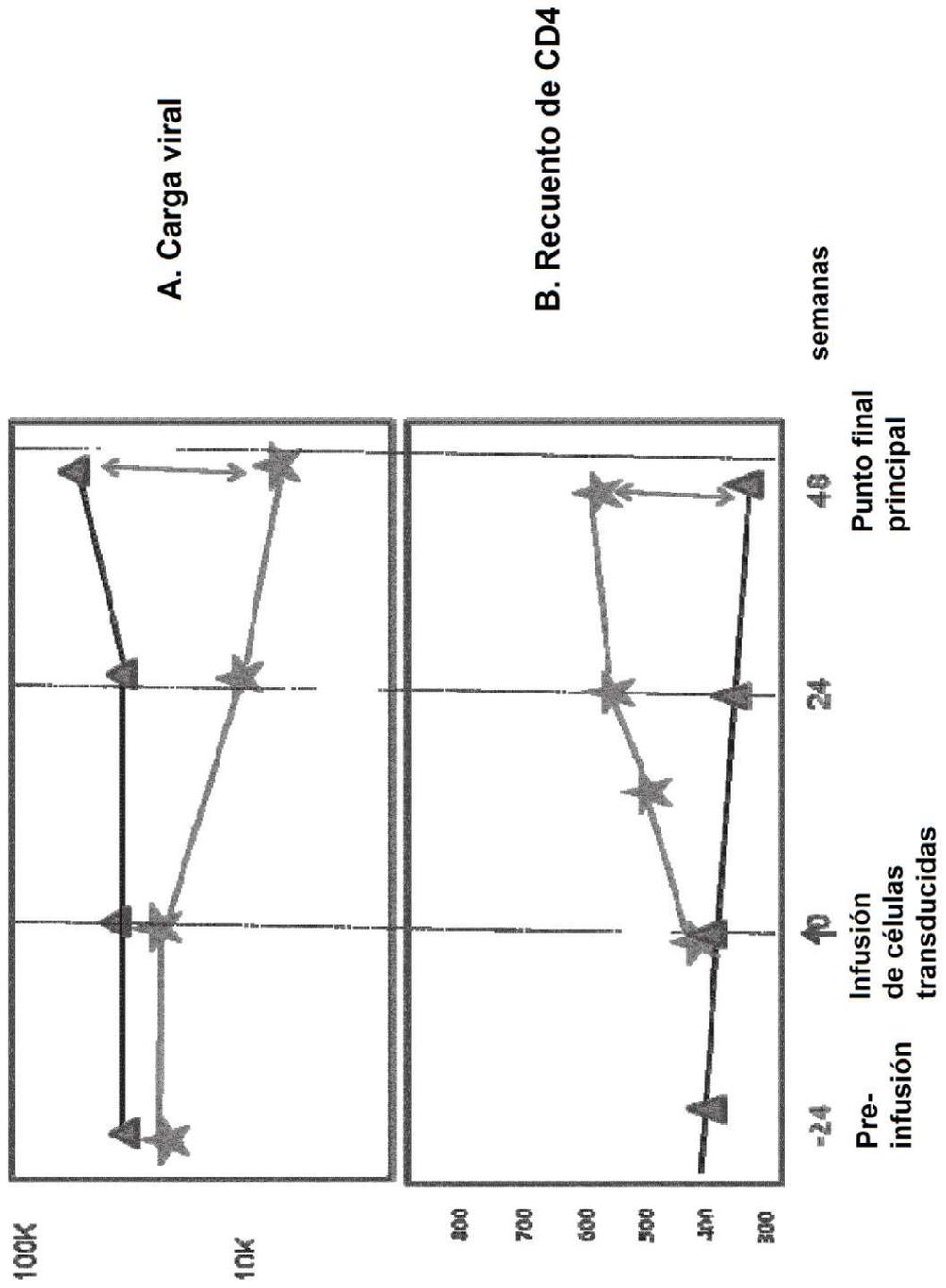


FIGURA 24

